

119

Klonierung
mikroinjizierbarer Genkonstrukte
und deren Nachweis in transgenen Tieren

Ein Beitrag zur Nutzung
transgener Tiere in der Tierzucht

Bertram Brenig

Disbui.

München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0028

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene
(Lehrstuhl: **Prof. Dr. H. Kräußlich**)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
und
dem Institut für Biochemie
(Lehrstuhl: **Prof. Dr. E.-L. Winnacker**)
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Dr. habil. G. Brem

Klonierung mikroinjizierbarer Genkonstrukte und deren Nachweis in transgenen Tieren

- Ein Beitrag zur Nutzung transgener Tiere in der Tierzucht -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

von
Bertram Brenig
aus
München

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. G. Brem

Korreferent: Prof. Dr. H. P. Jennissen

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 1
2	Möglichkeiten des Einsatzes transgener Tiere in der Tierzucht 2
3	Literaturübersicht 5
3.1	Transgene Tiere 5
3.2	Organspezifische Genexpression und Genregulation in transgenen Mäusen 6
3.3	Steuerbare Promotoren und ihre Verwendung für gezielte Genexpression 8
3.4	Onkogene in transgenen Mäusen 9
3.5	Insertionsmutanten 10
3.6	Das Mx-Influenzaresistenz-Gen der Maus. 11
4	Material 13
4.1	Bakterien, Plasmide, Zellen 13
4.2	Enzyme 14
4.3	Nukleinsäuren und Nukleotide 14
4.4	Chemikalien und andere Materialien 15
4.5	Geräte 17
4.6	Tiere 18
4.6.1	Maus 18
4.6.2	Kaninchen 19
4.6.3	Schwein 20
5	Methoden 21
5.1	Einführung 21
5.2	Klonierung mikroinjizierbarer Genkonstrukte 22
5.2.1	Bakterienkultur 22
5.2.1.1	Flüssigkultur 22
5.2.1.2	Plattenkultur 23

	Seite
5.2.2 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> JM83 und HB101	23
5.2.2.1 Reinigung von Plasmiden über CsCl-Dichtegradienten- zentrifugation	23
5.2.2.2 Schnellaufschlußverfahren von Übernachtskulturen zur Plasmid-Isolierung	25
5.2.2.2.1 Kochschnellaufschluß	25
5.2.2.2.2 Alkalischer Aufschluß	26
5.2.3 Abspaltung von 5'-Phosphatresten mit alkalischer Phosphatase	27
5.2.4 Auffüllung 5'-versetzter Enden mit dem Klenow-Fragment oder T4 DNA-Polymerase und Abspaltung 3'-versetzter Enden mit T4 DNA-Polymerase	28
5.2.5 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase	29
5.2.6 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> JM83 und HB101	30
5.2.6.1 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> JM83 und HB101	30
5.2.7 Nachweis rekombinanter Plasmide durch Kolonie- Hybridisierung	31
5.2.8 Sequenzierung doppelsträngiger DNA nach dem Didesoxy- Strangabbruchverfahren	32
5.2.8.1 Polyacrylamid-Sequenzgelelektrophorese	34
5.2.9 Zellkultur	35
5.2.9.1 Züchtung von BHK-Zellen in Monolayerkulturen	35
5.2.9.2 Transfektion von BHK-Zellen nach der Ca-Phosphat-Methode	36
5.2.10 Isolierung zytoplasmatischer RNA aus der Zellkultur	37
5.2.10.1 Gelelektrophorese von RNA in Formaldehyd-Gelen	38
5.2.10.2 Übertragung von RNA auf Nitrozellulosefilter (Northern Blot)	39
5.3 Isolierung und Reinigung mikroinjizierbarer DNA-Fragmente	40
5.3.1 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen mit DEAE-Zellulosemembranen	40
5.3.2 DNA-Fragmentisolierung aus niedrigschmelzender Agarose	41
5.3.3 Reinigung und Verdünnung isolierter DNA-Fragmente	41
5.4 Nachweis transgener DNA-Sequenzen in mikro- injizierten Tieren	42
5.4.1 Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA aus Gewebe und/oder Blut	42
5.4.1.1 Zerpulverung großer Gewebeproben in flüssigem Stickstoff	42
5.4.1.2 Aufbereitung kleiner Gewebeproben im Proteinase K-Lysispuffer	43

5.4.1.3	Anreicherung von Lymphozyten zur DNA-Isolierung im Ficoll-Paque™ Gradienten	43
5.4.1.4	Reinigung und Konzentrationsbestimmung	44
5.4.2	Hydrolyse hochmolekularer, genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen und Agarose-Gelelektrophorese. . . .	45
5.4.3	Übertragung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente auf Nitrozellulosefilter oder Nylonmembranen (Southern Blot)	46
5.4.3.1	Kopiezahlbestimmung durch Dot Blot-Analyse	47
5.4.4	Markierung von DNA-Fragmenten mit [α - 32 P]dCTP	48
5.4.4.1	Nick-Translation	48
5.4.4.2	Hexanukleotid "geprimte" DNA-Markierung	49
5.4.5	Hybridisierung filtergebundener DNA und Autoradiographie. . .	52
6	Ergebnisse	54
6.1	Klonierung des Plasmids pMTGRF-1.	54
6.1.1	Der Metallothionein-I Promotor der Maus (mMT-I) als regulatorisches Element	55
6.1.2	Der menschliche Wachstumshormon-Releasing Factor als Strukturgen.	58
6.1.3	3'-Expressionssignale aus dem kleinen t-Antigen von SV40 . . .	63
6.1.4	Kontrolle wesentlicher Expressionssignale durch Sequenzanalyse und <i>in vitro</i> -Transkription in BHK-Zellen	68
6.2	Genkonstrukte zur Erstellung transgener Tiere.	71
6.2.1	Das Plasmid pXGH-1	71
6.2.2	Das Plasmid pHMTII _A Mx	75
6.3	Nachweis transgener Tiere	78
6.3.1	Maus	78
6.3.2	Kaninchen	85
6.3.3	Schwein	90
6.3.3.1	Nachweis der Integration von MThGH	90
6.3.3.2	Nachweis der Integration von hMTII _A Mx	92
7	Diskussion	101
7.1	GRF und seine Bedeutung im Somatotropinstoffwechsel transgener Schweine	101
7.2	MThGH und hMTII _A Mx in transgenen Tieren	102

	Seite
7.3	Mikroinjizierte Genkonstrukte und ihre Integration ins Wirtsgenom 103
7.3.1	Integrationsmodelle bei transgenen Mäusen 105
7.3.2	Integrationsmodelle bei transgenen Kaninchen 108
7.3.3	Integrationsmodelle bei transgenen Schweinen 110
8	Anwendungen transgener Tiere in der Tierzucht 113
9	Zusammenfassung 114
	Summary 116
10	Literaturverzeichnis 118

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ap ^R	Ampicillin resistent
A _x	Extinktion bei der Wellenlänge x
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie (1Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Becquerel)
cm	Zentimeter
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
Da	Dalton
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobase
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x
PAA	Polyacrylamid
PBS-d	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PEG	Polyethylenglycoll
pUC	Plasmid University California

PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Dodecylhydrogensulfat Natriumsalz
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Lösung
Tab.	Tabelle
TE(10/1)	10 mM Tris/1 mM EDTA pH 7,5
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheit/unit
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Tab. 1	dNTP/ddNTP-Mischungen	33
Tab. 2	10 x Enzympuffer	46
Tab. 3	Integrierte Kopien/Zelle bei den Nachkommen von Maus Nr. 211	84
Tab. 4	Integrierte Kopien/Zelle bei den Kaninchen Nr. 18/5, 26, 38, 79-81, 062/7, 062/9 und 062/14 . . .	89
Tab. 5	Integrierte Kopien/Zelle bei den Schweinen Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481-II, 482 und 483 . .	92
Tab. 6	Integrierte Kopien/Zelle oder Äquivalente/Zelle bei den Schweinen Nr. 252, 257, 871-2 und 682-1	100

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	20 %-Polyacrylamid-Sequenzgel zur Isolierung von Zufallshexanukleotiden	51
Abb. 2	Struktur des mMT-I/GRF-Fusionsgens	55
Abb. 3	Sequenz des regulatorischen Bereichs des mMT-I Promotors	56
Abb. 4	Struktur des Plasmids HamerMT	57
Abb. 5	Struktur des <i>PvuI/BglIII</i> -Promotorfragments aus HamerMT	58
Abb. 6	Struktur des Plasmids LZPGRF 1/3 (Leu 27)	59
Abb. 7	DNA- und Aminosäuresequenz des kodierenden Bereichs des hGRF-Gens	60
Abb. 8	Restriktionsanalyse des Plasmids pMTGRF	61
Abb. 9	Rekonstruktion einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle	62
Abb. 10	Sequenzvergleich der Übergangsbereiche des mMT-I Promotors zum GRF- bzw. MT-Gen	62
Abb. 11	Struktur des Plasmids pSV2-cat ^s und des zur Konstruktion von pMTGRF-1 verwandten <i>HaeIII/BamHI</i> -Fragments.	64
Abb. 12 a	Kolonie-Hybridisierung von <i>E. coli</i> JM83 Klonen nach Transformation mit pMTGRF-1	65



	Seite
Abb. 12 b	Struktur des Plasmids pMTGRF-1 und des Genkonstrukts MTGRF-1 mit wesentlichen Expressionssignalen 66
Abb. 13	Strategie der Klonierung des Plasmids pMTGRF-1 . . . 67
Abb. 14	5 %-PAA-Sequenzgel zur Bestimmung der Nukleotidabfolge des GRF-Gens, der <i>Bgl</i> III/ <i>Eco</i> RI-Fusionsstelle von MTGRF und wichtiger Expressionssignale im Promotor 69
Abb. 15	Northern Blot-Analyse zytoplasmatischer RNA aus der Transfektion von BHK-Zellen mit pMTGRF-1 und pSV2-cat ^s 70
Abb. 16	Struktur des Plasmids pXGH-1 und partielle Restriktionsanalyse 72
Abb. 17 a	Struktur der 5'-Region des hGH-Gens 73
Abb. 17 b	Fusionsbereich von MThGH 73
Abb. 18	Struktur des Genkonstrukts MThGH 74
Abb. 19	Struktur des Plasmids pHMTII _A Mx 75
Abb. 20	Aufbau des Genkonstrukts hMTII _A Mx und Spaltungsmuster der Restriktionsendonukleasen <i>Pst</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Hind</i> III und <i>Taq</i> I sowie die Fragmentlängen bei Hydrolyse mit <i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I, <i>Hind</i> III/ <i>Pvu</i> II und <i>Pvu</i> II/ <i>Pst</i> I 76
Abb. 21	Southern Blot-Analyse der Maus Nr. 511 79
Abb. 22	Southern Blot-Analyse der Maus Nr. 911 80
Abb. 23	Southern Blot-Analyse der Maus Nr. 211 und 211-I-4 81
Abb. 24	Southern Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211 81
Abb. 25	Southern Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211 82
Abb. 26	Southern Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211 83
Abb. 27	Dot Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211 zur Bestimmung der Anzahl der Kopien/Zelle 84
Abb. 28	Southern Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 79-80, 26 und 38 85

	Seite
Abb. 29	Southern Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 18/5, 79-81, 26 und 38 86
Abb. 30	Southern Blot-Analyse des Kaninchens Nr. 18/5 87
Abb. 31	Southern Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 062/7, 062/9 und 062/14 88
Abb. 32	Dot Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 18/5, 79-81, 26, 38, 062/7, 062/9 und 062/14 zur Bestimmung der Anzahl der Kopien/Zelle 89
Abb. 33	Southern Blot-Analyse der Schweine Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481, 482 und 483 90
Abb. 34	Southern Blot-Analyse der Schweine Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481-I, 481-II, 483, 2267 91
Abb. 35	Southern Blot-Analyse der Schweine Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481, 482 und 483 91
Abb. 36	Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 871-2 93
Abb. 37	Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 257. 94
Abb. 38	Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 257. 95
Abb. 39	Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 257. 96
Abb. 40	Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 252. 97
Abb. 41	Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 252. 98
Abb. 42	Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 682-1. . . . 99
Abb. 43	Dot Blot-Analyse der Schweine Nr. 252, 257, 871-2 und 682-1 zur Bestimmung der Anzahl der Kopien/Zelle 100
Abb. 44	Integrationsmodell bei den Mäusen Nr. 211-I-3 und 211-I-7 106
Abb. 45	Integrationsmodell bei den Mäusen Nr. 211-I-5, 211-II-7 und 211-III-1 107
Abb. 46	Integrationsmodell bei den Kaninchen Nr. 062/7 und 062/9 109
Abb. 47	Integrationsmodell bei dem Schwein Nr. 871-2. 110
Abb. 48	Integrationsmodell bei dem Schwein Nr. 257. 111



Die Erstellung transgener Tiere ist nicht nur von großem wissenschaftlichen Interesse, sondern besitzt auch wirtschaftlich gesehen einen hohen Wert (Hammer *et al.*, 1985 a).

Tiere, die Träger fremden genetischen Materials sind, bieten die Möglichkeit, Vorgänge eukaryontischer Genregulation zu erforschen (Gordon *et al.*, 1980), tierzüchterisch wertvolle genotypische Eigenschaften artübergreifend zu etablieren (Lovell-Badge, 1985) oder organspezifische Expression zum Zweck des "gene farmings" (Williams, 1982) zu nutzen.

Durch Mikroinjektion Hormon oder Releasing-Hormon kodierender Gen - konstrukte (z. B. Wachstumshormongen und Wachstumshormon-Releasing Factor-Gen) und deren dauerhafte Integration in die Keimbahn transgener Nutztiere ist man in der Lage, fundamentale Lebensprozesse, z. B. den Leistungsstoffwechsel, zu beeinflussen.

Mit fortschreitender Aufklärung von Krankheitsresistenzmechanismen, die auf der Gegenwart eines einzigen Gens beruhen (z. B. Mx-Gen), kann versucht werden, über DNA-Mikroinjektion transgene Tiere zu erzeugen und Tierbestände, die gegenüber bestimmten Krankheitserregern (z. B. Orthomyxoviren) genetisch resistent sind, aufzubauen.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es, Tiere (Mäuse, Kaninchen, Schweine) aus Mikroinjektionen der Genkonstrukte MThGH und hMTII_AMx auf Integration der Fremd-DNA zu untersuchen. Die hierzu notwendigen Verfahren sollten in der Arbeitsgruppe etabliert und optimiert werden, um einen raschen und sicheren Nachweis der Integration mikroinjizierter Gene zu führen.

Weiterhin sollte ein Genkonstrukt mit dem Wachstumshormon-Releasing Factor-Gen des Menschen kloniert werden, das sich für die Mikroinjektion zur Erzeugung transgener Tiere eignet.

(Übersichtsartikel: Church *et al.*, 1985; Clark *et al.*, 1987; Kräußlich, 1986; Land and Wilmut, 1987; Smith *et al.*, 1987; Wagner, 1985; Ward *et al.*, 1986)

Die traditionellen Methoden der Nutztierzucht werden in zunehmendem Maße durch Techniken aus der Zell- und Molekularbiologie ergänzt oder ersetzt.

Mit dem Einsatz dieser Methoden konnte bereits die Verbesserung qualitativer und quantitativer Merkmale wichtiger landwirtschaftlicher Nutztiere erreicht werden. Die Verwendung der künstlichen Besamung, des Embryotransfers, der *in vitro*-Fertilisierung und Embryotiefkühlkonservierung bietet die Möglichkeit, kontrolliert in die Vorgänge der Reproduktion einzugreifen.

In den letzten Jahren verlagerte sich jedoch das Interesse von der Gewinnung, Aufbewahrung und dem Transfer von Embryonen auf den Bereich der Mikromanipulation. Dieser beinhaltet zum einen die mikrochirurgischen Techniken der Embryoteilung, der Herstellung von Chimären und der Klonierung von Nutztieren, zum anderen die Produktion von transgenen Tieren durch Mikroinjektion *in vitro* rekombinierter Gene oder Genkonstrukte in befruchtete Eizellen. Durch die Übertragung von Fremdgenen in die Keimbahn landwirtschaftlicher Nutztiere werden Zwischenschritte der Nutztierzucht verkürzt und das erwünschte Ziel schneller erreicht.

Folgende Anwendungsbereiche transgener Tiere in der Nutztierzucht lassen sich erkennen:

1. Die Mikroinjektion Hormon oder Releasing-Hormon kodierender Gene unter der Kontrolle steuerbarer Promotoren oder Enhancer führt zur erhöhten Bildung und Ausschüttung jedes beliebigen Hormons. In der Tierzucht spielen dabei Hormone, die den Leistungsstoffwechsel (Wachstum, Milchproduktion) und die Reproduktion beeinflussen, eine wichtige Rolle. Hierzu gehören die Wachstumshormone mit den ihnen übergeordneten, regulierenden Hormonen und den ihnen untergeordneten Wachstumsfaktoren. Im Bereich der Reproduktion ist z. B. an den Einsatz des Gonadotropin-Releasing-Factor-Gens zu denken.

2. Die Rentabilität tierischer Produktion wird maßgebend von der Fütterung und den damit verbundenen Kosten beeinflusst. Rationelle und zweckmäßige Fütterung kann sich aber u. a. nur dann positiv auswirken, wenn die komplizierten Regulationsmechanismen des Energieverbrauchs und der Energieaufnahme über bestimmte Enzyme beeinflusst werden können.

Durch die Mikroinjektion enzymkodierender Gene wäre es möglich, neue Stoffwechselwege einzuführen oder bestehende durch erhöhte Bereitstellung essentieller Substanzen (z. B. Aminosäuren) zu verbessern.

3. Neben der Beeinflussung der Zusammensetzung der Milch, besteht die Möglichkeit, auch andere tierische Produkte (z. B. Wolle) in ihrer Qualität durch die Produktion transgener Tiere zu verändern.

Im besonderen wird daran gedacht, die Aminosäurezusammensetzung der Wolle durch die Mikroinjektion rekombinanter Gene der Keratin-Genfamilie zu beeinflussen. Hierbei ist es von Bedeutung, geeignete Promotoren zu finden, die eine organspezifische Expression ermöglichen.

4. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Genen charakterisiert und kloniert, die für medizinisch wichtige Proteine kodieren. Hierzu gehören z. B. das Insulin, das α -1 Antitrypsin, die Antihäemophilen-Faktoren A und B sowie der Plasminogenaktivator. Die Isolierung und Reinigung dieser Proteine aus Blut oder Gewebe ist zeitaufwendig und kostenintensiv. Auch die Expression in *E. coli* ist oft unbefriedigend, da bestimmte Proteine nicht korrekt modifiziert werden.

Mit der Produktion transgener Nutztiere ist man in der Lage, größere Mengen bestimmter Proteine zu synthetisieren und ihre Bildung sowie Ausschüttung durch die Verwendung organspezifischer Promotoren, z.B. auf die Milchdrüse, zu beschränken ("gene farming"). Die Gene wichtiger Milchproteine (α _{S1}-, α _{S2}-, β -, κ -Kasein; α -Lactalbumin; β -Lactoglobulin) kommen nur in einer Kopie/Zelle vor und sind damit molekularbiologischen Manipulationen zugänglich.

5. Besondere Bedeutung, nicht nur für landwirtschaftliche Nutztiere, haben Resistenzmechanismen, von denen einige bereits bekannt und untersucht sind. Bei der Erstellung transgener Nutztiere ist u. a. an den Einsatz des Influenza-resistenz-Gens Mx der Maus (vgl. dazu Kap. 3.6) zu denken.

Auch die Aufklärung des polygenen Merkmals der Trypanotoleranz des Ndama Rindes macht einen Einsatz in transgenen Tieren möglich. Durch Mikroinjektion antikörperkodierender Gene und deren Integration in die Keimbahn transgener Nutztiere wäre es ebenfalls möglich, gegenüber bestimmten Krankheiten resistente Tiere zu erzeugen.

Mit der Produktion transgener Nutztiere und der damit verbundenen dauerhaften Integration neuer genetischer Merkmale in die Keimbahn dieser Tiere und ihrer Nachkommen ist man in der Lage, die großen Zeitabläufe der klassischen Nutztierzucht zu verkürzen. Der Gentransfer stellt eine weitere Innovation der modernen Tierzucht und Tierproduktion dar und ist die konsequente Folge aus den mit dem Embryotransfer verbundenen Techniken.

3.1

Transgene Tiere

Erste Versuche zur Kombination verschiedener Genotypen von Säugetieren wurden durch mikrochirurgische Eingriffe an Mausembryonen unternommen (Tarkowski, 1961; Mintz, 1962). Wegbereitend für die Technik des Gen-transfers war die Produktion von Mauschimären durch Aggregation verschiedener zwei- oder mehrzelliger Embryonen oder die Verwendung von in Blastozysten verbrachter transfizierter Teratokarzinomzellen (Brem, 1986; Gordon, 1983). Ein großer Nachteil dieser Methoden besteht in der sehr seltenen Keimbahnintegration des fremden Genoms (Papaianou *et al.*, 1978). Um eine dauerhafte Integration in das gesamte Wirtsgenom zu erhalten, wurden in der Folge Viren und virale Vektoren erprobt.

Mausembryonen wurden zu verschiedenen Entwicklungsstadien mit dem Affenvirus 40 (SV40) bzw. SV40-DNA infiziert oder SV40-DNA ins Blastocoel injiziert (Jaenisch and Mintz, 1974; Jaenisch, 1974). Das Vorhandensein viraler DNA-Sequenzen konnte während der weiteren Teilung (Baranska *et al.*, 1971) und Entwicklung (Sawicki *et al.*, 1971) sowie durch die spätere SV40-Antigenexpression (Abramcauk *et al.*, 1978) gezeigt werden (Gordon, 1983). Auch hier wurde in den seltensten Fällen eine Keimbahnintegration erzielt (Kelly and Condamine, 1982). Erst mit der Verwendung des murinen Moloney-Leukämievirus (MoMuLV) gelang Jaenisch (1976) und Jaenisch *et al.* (1983) eine Integration in die Keimbahn. In den folgenden Experimenten zeigte sich jedoch, daß die Integration proviraler DNA weniger die Folge der Mikroinjektion als vielmehr das Ergebnis der Expression viraler Funktionen war (Gordon, 1983). Während die MoMuLV-DNA in mikroinjizierten Tieren nachweisbar war, ging die gleichzeitig mikroinjizierte VektordNA von pBR322 verloren.

Die Erzeugung transgener Mäuse durch Integration viraler DNA bietet zwar die Möglichkeit, Expressionsmechanismen von Viren zu studieren, der Transfer nicht viraler DNA ist jedoch mit dieser Methode nicht möglich.

Es mußten deshalb Techniken entwickelt werden, die den Transfer beliebiger DNA-Sequenzen ermöglichen und auch zu einer Keimbahnintegration dieser DNA führen.

Gordon *et al.* (1980) gelang es erstmals, durch Mikroinjektion des rekombinanten Plasmids pST6, bestehend aus dem Herpes Simplex-Virus Typ 1 (HSV-I) -Thymidin-Kinase-Gen, dem Ursprungspunkt der DNA-Replikation und Promotor von SV40 und pBR322, in die Vorkerne befruchteter Eizellen transgene Mäuse zu produzieren. Seither wurde die Mikroinjektionstechnik in einer Reihe von Laboratorien zur Erstellung transgener Mäuse mit verschiedensten Konstrukten eingesetzt und verbessert.

Neben der Erstellung transgener Mäuse wurden Mikroinjektionen auch bei *Drosophila* (Spradling and Rubin, 1983; Goldberg *et al.*, 1983), *Xenopus* (Wilson *et al.*, 1986), Fischen (Rokkones *et al.*, 1985; Ozato *et al.*, 1986; Zhu *et al.*, 1985; Chourrout *et al.*, 1986), Kaninchen (Brem *et al.*, 1985; Hammer *et al.*, 1985 a), Schweinen (Brem *et al.*, 1985; Hammer *et al.*, 1985 a) und Rindern (Kraemer, 1986; Lohse, 1985) durchgeführt. De la Pena *et al.* (1987) gelang durch Mikroinjektion die Produktion transgenen Roggens.

Durch transgene Tiere lassen sich Fragen zur organspezifischen Genexpression und deren physiologische Folgen auf das Wirtstier beantworten. Ein weites Feld bietet die Erforschung der Tumorentstehung durch Mikroinjektion von Onkogenen oder Genen mit transformierenden Eigenschaften.

3.2 Organspezifische Genexpression und Genregulation in

transgenen Mäusen

Zur Aufklärung der Regulationsmechanismen differentieller eukaryontischer Genexpression während der embryonalen und fetalen Entwicklung und im adulten Tier wurden verschiedene transgene Mauslinien erstellt.

Ein interessantes Modell zur Untersuchung *cis* und *trans* aktivierender Elemente ist die vom Embryo über den Fetus zum erwachsenen Tier wechselnde Globingenexpression.

Hierzu wurden unterschiedliche Globingenkonstrukte in die Keimbahn transgener Mäuse eingeschleust. Durch Northern-, S1-Nuklease- und Primer-

Ausdehnungsanalysen wurde die entwicklungsstadienabhängige Expression des fetalen (Chada *et al.*, 1986) und des adulten (Townes *et al.*, 1985; Kollias *et al.*, 1986) menschlichen β -Globingens in transgenen Mäusen untersucht. Andere transgene Mäuse wurden mit dem menschlichen bzw. fetalen $A\gamma$ -Globingen (Kollias *et al.*, 1986) und Hybridglobingen, bestehend aus dem 5'- γ -fetalen und 3'- β -adulten Globingen des Menschen (Kollias *et al.*, 1986) oder 5'- β -Maus- und 3'- β -menschlichen Globingen (Radice and Costantini, 1986; Magram *et al.*, 1985), erzeugt. Von Costantini and Lacy (1981) wurden transgene Mäuse mit dem β -Globingen des Kaninchens untersucht. Um einen genaueren Einblick in die Bedeutung 5'-regulierender Sequenzen zu bekommen, untersuchten Townes *et al.* (1985) auch die Expression des β -Globingens des Menschen an 5'-Deletionskonstrukten.

Durch Mikroinjektion eines rekombinanten Immunglobulin κ -Gens konnte von Brinster *et al.* (1983) die organspezifische Expression in der Milz transgener Mäuse und von Storb *et al.* (1984) ausschließlich in den B-Lymphozyten dieser Tiere gezeigt werden. Bei der Verwendung eines Konstrukts mit dem Enhancer des Gens der schweren Kette beschränkte sich die Expression des regulierten Gens auf B-Lymphozyten (Gerlinger *et al.*, 1986).

Neben den Globin- und Immunglobulingenen eignen sich Gene des MHC-Komplexes für Studien organspezifischer Genexpression.

Durch Mikroinjektion des E_α^k (LeMeur *et al.*, 1985) oder E_α^d (Pinkert *et al.*, 1985; Yamamura *et al.*, 1985) MHC II-Gens in C57BL/6 Mäuse, die durch eine 5'-Deletion des endogenen E_α -Gens nicht in der Lage sind, funktionelle E_α -Moleküle zu synthetisieren, konnte die Bildung des intakten $I-E_\alpha^kE_\beta$ bzw. $I-E_\alpha^dE_\beta$ Antigens auf der Oberfläche von B-Lymphozyten und Monozyten erreicht werden. Dadurch wurde die natürliche Immunreaktion auf poly(L-Glu - taminsäure - L-Lysin - L-Phenylalanin) wiederhergestellt (Steinmetz, 1985).

Organspezifische Expression wurde weiterhin an transgenen Mäusen, die das Elastase I-Gen des Pankreas der Ratte (Swift *et al.*, 1984), Gene des α -Fetoproteins (Krumlauf *et al.*, 1986), das aviäre Transferringen (Hammer *et al.*, 1986) und ein CAT-Konstrukt mit dem $\alpha_2(I)$ -Kollagen Promotor (Khillan *et al.*, 1986) durch Mikroinjektion in ihr Genom integriert hatten, untersucht.

Die molekularen Grundlagen der Entstehung von Autoimmunkrankheiten (z. B. Myasthenia gravis, perniziöse Anämie, Addison'sche Krankheit) sind noch nicht im Detail geklärt. Am Beispiel transgener Mäuse konnten Adams *et al.* (1987) die Entstehung von Autoantikörpern untersuchen.

Sie fusionierten die regulatorischen Sequenzen des Insulin II-Gens der Ratte mit den kodierenden Bereichen des T-Antigens von SV40 und erstellten damit transgene Mäuse. Durch die Verwendung des Insulin II-Promotors konnte eine zellspezifische Expression in den β -Zellen des Pankreas erreicht werden. Gleichzeitig entwickelten transgene Mäuse spezifische β -Zelltumoren, die nicht mit der Entstehung von Autoantikörpern gegen das produzierte T-Antigen in Verbindung standen. Die Bildung der Autoantikörper war die Folge einer verzögerten Expression des Genkonstrukts während der Embryogenese.

Je mehr man über die Wirkungsweise von Enhancern in Abhängigkeit von der Chromatinstruktur und vom nukleären Milieu weiß, desto besser wird man in der Lage sein, eine Aussage über den Einfluß des Integrationsorts auf die Expression eines mikroinjizierten Gens zu machen. Durch die geschickte Kombination von Enhancern, Promotoren und flankierenden Sequenzen wäre es dann möglich, mikroinjizierte Gene in jedem beliebigen Gewebe effizient zu exprimieren (Hogan, 1983).

3.3

Steuerbare Promotoren und ihre Verwendung für gezielte

Genexpression

Die Verwendung steuerbarer Promotoren in transgenen Tieren dient u.a. der Aufklärung physiologischer Folgen einer Fremdgenexpression.

Ein häufig verwendeter Promotor dieser Art ist der des Metallothionein-I Gens der Maus. Durch Fusion mit unterschiedlichen Strukturgenen konnte bereits in vielen Beispielen die Wirkung einer erhöhten Fremdgenexpression, z. B. von Wachstumshormon-Genen, gezeigt werden (Palmiter *et al.*, 1982 a, b; Palmiter *et al.*, 1983; Brem *et al.*, 1985; Swanson *et al.*, 1985; Low *et al.*, 1985; Low *et al.*, 1986).

Ein nicht durch Schwermetalle oder Glucocorticoide, sondern durch ontogenetische Prozeße gesteuerter Promotor ist der Promotor der MHC I H-2K^b-Gene. Morello *et al.* (1986) untersuchten die Wirkung dieses Promotors an transgenen Riesenmäusen.

Der Promotor des Mx-Influenzaresistenz-Gens der Maus läßt sich durch Gaben des murinen Interferon- α mindestens 20-fach induzieren (Noteborn, 1987). Er reguliert die Expression des Mx-Gens während einer Influenzainfektion.

3.4

Onkogene in transgenen Mäusen

Untersuchungen zur Tumor- und Onkogenese konzentrieren sich in zunehmendem Maße auf die Klärung der Funktion von Produkten von Onkogenen oder Tumoviren und den molekularen Mechanismen der Tumorentstehung (Hanahan, 1984).

Eine Reihe von Experimenten wurde mit Genkonstrukten durchgeführt, die aus den "long terminal repeats" (LTR) des Mammatumovirus der Maus (MTV) und dem *c-myc* Onkogen (Stewart *et al.*, 1984; Leder *et al.*, 1986) oder dem Herpes Simplex I-Thymidin-Kinase-Gen (Ross and Solter, 1985) bestehen. Transgene Mäuse entwickelten neben spontanen Mammatumoren eine Vielzahl weiterer Neubildungen.

Häufig verwendet werden auch Konstrukte mit Anteilen des Affenvirus 40 (SV40). Entweder wurden bestehende Genkonstrukte (z. B. MThGH) zusätzlich unter die Kontrolle von Enhancerbereichen von SV40 gebracht (Brinster *et al.*, 1984; Palmiter *et al.*, 1985; Messing *et al.*, 1985) oder SV40 kodierende Sequenzen (z. B. T-Antigen) durch Promotoren anderer Gene reguliert (Hanahan, 1985). In jedem Fall produzierten transgene Mäuse charakteristische Neubildungen in den für den regulatorischen Bereich typischen Organen.

Die tumorigene Wirkung der frühen Regionen der Papovaviren JC und BK des Menschen, die strukturelle Ähnlichkeiten mit SV40 aufweisen, konnte ebenfalls in transgenen Mäusen gezeigt werden (Small *et al.*, 1986 a, b).

Die Integration mikroinjizierter Konstrukte ins Genom erfolgt weitgehend zufällig. Bei ungefähr 20 % aller aus Mikroinjektionen stammenden Tiere dürfte der Einbau der Fremd-DNA in funktionelle Bereiche des Wirtsgenoms stattfinden und zur Mutation des betroffenen Gens führen (Marx, 1985). Je nachdem, ob dadurch die Funktion eines dominanten oder rezessiven Gens gestört wird, ist die phänotypische Ausprägung bei heterozygoten oder homozygoten Tieren zu erwarten.

Durch Kreuzung heterozygoter MMTV/*myc*-transgener Mäuse erzeugten Woychik *et al.* (1985) homozygote MMTV/*myc*-Tiere, die umfangreiche Deformationen des Gliedmaßenskeletts aufwiesen. Mittels *in situ*-Hybridisierungen konnte der Integrationsort des Konstrukts auf Chromosom 2 dicht unterhalb der C1 Bande lokalisiert werden. Dies ist zugleich der Ort zweier seit langem bekannter natürlicher Mutationen, die zu Deformationen (*ld^J* und *ld^{OR}*) der Gliedmaßen führen. Durch die Insertion war ein für die Gliedmaßenentwicklung verantwortliches Gen mutiert worden.

Wagner *et al.* (1983) berichten über die letalen Folgen einer Integration bei zwei durch Kreuzung phänotypisch unauffälliger, heterozygoter, transgener Mäuse erstellten homozygoten Mauslinien HUGH/3 und HUGH/4.

Mutationen des Skeletts, der Augen, defekte Pigmentation, reduziertes Wachstum und Fruchtbarkeitsstörungen, die durch die Integration eines Konstrukts mit dem Dihydrofolat-Reduktase-Gen (DHFR-Gen) erzeugt wurden, beschreibt Gordon (1986) bei verschiedenen heterozygoten transgenen Mäusen. In diesem Fall sind die Veränderungen jedoch nicht auf die Unterbrechung eines bestimmten endogenen Gens zurückzuführen, sondern die Folge der Expression des integrierten Genkonstrukts.

Durch die Integration eines mikroinjizierten Genkonstrukts müssen aber nicht nur Mutationen hervorgerufen werden, die sich letal für die entsprechenden Tiere auswirken, sondern es können möglicherweise auch bestehende Defekte korrigiert werden. Eine derartige Korrektur konnte bisher nur in Kulturzellen erreicht werden. Durch Mikroinjektion einer Neomycingen-Mutante in die Zellkerne einer Mausfibroblastenzelllinie LMtk⁻, die bereits ein mutiertes *Neo^R*-Gen durch Mikroinjektion integriert hatte, konnte durch homologe

Rekombination die Funktion des Neomycinresistenz-Gens wiederhergestellt werden (Thomas and Capecchi, 1986). Dieser Vorgang wurde als hetero - duplex induzierte Mutagenese bezeichnet (Liskay, 1986).

Die Erzeugung von Mutationen, sei es durch einfache Insertion, Genexpres - sion oder homologe Rekombination, eröffnet die Möglichkeit, die Bedeutung bestimmter Gene für die Ontogenese, deren Funktion im Organismus und ihre chromosomale Position zu erforschen.

3.6 Das Mx-Influenzaresistenz-Gen der Maus

Die erbliche allgemeine Unempfindlichkeit (Resistenz) eines Organismus gegenüber Krankheitserregern ist seit langem bekannt. Nach der Charakte - risierung des Interferons (IFN) und seiner Bedeutung bei viralen Infektionen (Isaacs and Lindenmann, 1957) wurden auch spezifische Resistenzen gegenüber einzelnen Gruppen von Viren beschrieben (Lindenmann, 1962; Lindenmann *et al.*, 1963; Haller and Lindenmann, 1974).

Lindenmann (1962) und Haller *et al.* (1979; 1980 a, b) konnten bei dem Mausinzuchtstamm A2G eine Resistenz gegenüber Influenza A-Viren fest - stellen, die sich nicht ausschließlich aus der Wirkung von Interferon erklären ließ. Auch wenn durch die Applikation von Anti-Interferon Antiseren zunächst resistente Mäuse empfänglich für eine Infektion mit mausadaptierten Influenza A-Viren wurden, konnte bei nicht resistenten Mäusen keine Resistenz durch Gabe von Interferon erreicht werden. Die Resistenz dieses Mausstamms mußte folglich auf einem weiteren, aber durch Interferon regulierbaren oder ab - hängigen Mechanismus beruhen. Lindenmann (1964) gelang es, die Ursache der Resistenz einem einzigen Genlocus, den er mit Mx bezeichnete, zu - zuordnen. Der Mausinzuchtstamm A2G ist homozygot für das dominante Allel Mx. *In vivo* und *in vitro* Experimente zeigten, daß die Resistenz auf Influenza - Viren beschränkt und durch Interferon- α/β reguliert war. Interferon- γ hatte dagegen keinen Einfluß. Dreiding *et al.* (1985) isolierten ein Protein, das sich während einer Influenzainfektion im Zellkern anreichert, durch Interferon- α/β induzierbar und antiviral wirksam ist.

Dem Mx ähnliche Proteine wurden auch in Lymphozyten und Fibroblasten des Menschen (Staeheli and Haller, 1985) und der Ratte entdeckt (Staeheli *et al.*, 1985). Dieses Protein (75 000 Da) wurde mit Mx und Mäuse, die Träger des dominanten Allels Mx sind, in der Folge als Mx⁺ bezeichnet (Haller *et al.*, 1981).

Der exakte antivirale Mechanismus des Mx ist noch nicht geklärt. Erste Ergebnisse deuten jedoch daraufhin, daß Mx die Synthese (Initiation oder Elongation) viraler mRNA in unterschiedlichem Maße inhibiert und somit nicht wie IFN bzw. das durch IFN induzierte TIP (translation inhibiting protein) die Translation blockiert (Krug *et al.*, 1985).

Staeheli *et al.* (1986 a) gelang die Lokalisation des Mx-Allels auf Chromosom 16 der Maus und die Isolierung der kodierenden Bereiche des Gens aus einer cDNA-Bank (Staeheli *et al.*, 1986 b). Er konnte durch Transfektion eines Konstrukts, bestehend aus dem frühen SV40-Promotor und der MxcDNA aus dem Plasmid pMx34, Balb/c-3T3 Zellen, die Mx⁻ und deshalb influenza - empfänglich sind, resistent gegenüber Influenza-Infektion machen.

4.1 Bakterien, Plasmide, Zellen

Aus der Stammsammlung des Instituts für Biochemie der Universität München, Abt. Prof. Winnacker wurden verwendet:

E. coli JM83

ara, $\Delta[lac, pro]$, *strA*, *thi-1*, [$\Phi 80dlacZ\Delta M15$]

(Vieira and Messing, 1982)

E. coli HB101

F⁻, *hsdS20* (r_B , m_B), *supE44*, *ara-14*, *galK-2*, *lacY1*, *proA2*,

rpsL20 (*str^R*), *xyl-5*, *mtl-1*, λ^- , *recA13*

(Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)

pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

Die Plasmide HamerMT und pSV2-cat^s, sowie die BHK (tk-ts13)-Zellen wurden von Herrn Dr. M. Lipp zur Verfügung gestellt.

Das Plasmid pXGH-1 stammt von Prof. H. M. Goodman, MGH Boston, USA.

Das Plasmid LZPGRF 1/3 (Leu 27) wurde von Herrn Dr. W. Wetekam, Hoechst, freundlichst zur Verfügung gestellt.

Das Plasmid ZpSP⁶⁴/₆₅/rchr β G Δ 570/huMTII_A Δ 836/Mx Δ 2167/mchr β G Δ 1500 (phMTII_AMx) stammt von Prof. Ch. Weissmann, ETH Zürich.

Enzyme

Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu Isenburg; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; New England Biolabs GmbH, Schwalbach; Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg; Renner GmbH, Dannstadt:
Restriktionsendonukleasen

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:
Alkalische Phosphatase; DNA-Polymerase I; Lysozym; Ribonuklease A

New England Biolabs GmbH, Schwalbach:
Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I; T4 DNA-Ligase; T4 DNA-Polymerase

E. Merck, Darmstadt:
Proteinase K aus *Tritirachium album*

Nukleinsäuren und Nukleotide

Amersham und Buchler, Braunschweig:
[α -³²P]dCTP (3 000 Ci/mmol); [α -³⁵S]thiodATP (650 Ci/mmol)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:
2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphate (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP); Adenosin-5'-triphosphat (ATP)

Sigma Chemie GmbH, München:
Kalbsthymus-DNA; Lachssperma-DNA

Oligonukleotide:

Die Oligonukleotide für die Sequenzierung wurden von R. Mertz (Genzentrum der Universität München) am vollautomatischen "DNA-Synthesizer" Modell 380A der Firma Applied Biosystems hergestellt.

Chemikalien und andere Materialien

Amersham und Buchler, Braunschweig:

Hybond-N™(Nylon) Membrane

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Tris; Dithiotreitol (DTT)

Dazey Products, Kansas, USA:

Seal-a-meal™

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Bacto-Yeast-Extract

Eastman Kodak Company, Rochester N.Y., USA:

Röntgenfilm X-Omat AR XAR5

E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumacetat; Ammoniumperoxodisulfat; Ammoniumsulfat; Borsäure; Bromphenolblau; n-Butanol; Calciumchlorid; Chloroform; Essigsäure; Ethanol; Ethylendiamintetraessigsäure; Formaldehyd; Formamid; Glucose; Guanidin - thiozyanat; Glycerin; Isoamylalkohol; Isopropanol; Kaliumchlorid; Kaliumhydrogensulfat; Kieselgel 60 F 254 DC-Platten; Magnesiumchlorid; Magnesiumsulfat; Natriumacetat; Natriumchlorid; Natriumcitrat; Natrium - dodecylsulfat; Natriumhydrogenphosphat; Natriumhydroxid; Paraffin; Phenol; Polyethylenglycoll 8 000; Triton® X-100; Saccharose; Salzsäure

Seromed® Biochrom KG, Berlin:

Foetales Kaelberserum (Mycoplasmen getestet)

Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Ethanol; Formamid

Gelman, Ann Arbor, Michigan, USA:

Acrodisc eingefaßte Membranfilter 0,2 µm und 0,45 µm

Greiner, Nürtingen:

Plastikreagenzröhrchen; Zellkulturflaschen

Nunc GmbH, Wiesbaden:
Petrischalen, Zellkulturflaschen

Photo Schaja:
Polaroidfilm Typ 107

Renner GmbH, Dannstadt:
Dounce-Gewebehomogenisator; Impfnadeln; Kanülen; Küvetten; Tiefgefrier-
röhrchen; Magnetrührer; Pasteurpipetten; Petrischalen; Pipetboy; Pipetten -
spitzen; PVC-Sauger; Reaktionsgefäße (Eppendorf); Schutzabschirmung;
Serologische Pipetten; Szintillationsfläschchen; Ultraviolett-Transilluminator
(366 nm); Zentrifugenröhrchen

Rühl-Chemie, Friedrichsdorf:
Caesiumchlorid

Schleicher & Schuell GmbH, Dassel:
DEAE-Zellulosemembran NA45; Nitrozellulosefilter BA85

Serva, Heidelberg:
Acrylamid; Dialyseschlauch; Ethanol; Glaswolle (silanisiert); Harnstoff; N-
Lauroylsarkosin 35 % Natriumsalz; N,N'-Methylen-bisacrylamid; N,N,N',N'-
Tetramethylethylendiamin; Polyvinylpyrrolidon; 2-Xylencyanol

Sigma Chemie GmbH, München:
Agarose; Ampicillin; 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid; Di-
methyldichlorsilan; Ethidiumbromid; Ficoll 400; β -Mercaptoethanol;
 γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan; 3-(N-Morpholino)propansulfon-
säure; Rinderserumalbumin; Trizma Base

Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA:
3MM Whatman Papier

Geräte

Beckmann Instruments GmbH, München:

Ultrazentrifuge L8-M

Berthold GmbH, München:

Automatic TLC-Linear Analyzer LB 2820-1; Chromatography Data System LB 512

Branson Sonic Power Company, Schwäbisch Gmünd:

Sonifier B12

Desaga, Heidelberg:

Min UVIS UV 254/366nm

DuPont und Sorvall Instruments, Bad Nauheim:

Zentrifuge Sorvall RC-5, RC-5C; Ultrazentrifugen OTD-65B, OTD-2; Rotoren SS34, GSA, GS3, TV865, TST 41.14

Haereus Christ, Osterrode:

Labofuge II

Hoefer Scientific Instruments, Heidelberg:

Power Supply PS 500X

LKB, Gräfelfing:

Macrophor™ Sequencing System

New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, New Jersey, USA:

Wasserbadsschüttler Model G76D; Schüttelinkubator Model G25

Renner GmbH, Dannstadt:

Folienschweißgerät; Magnetrührer; Eppendorf Zentrifuge 5415

Searle GmbH, Heusenstamm:

Flüssigszintillationszähler Modell 6892

4.6 Tiere

4.6.1 Maus

Folgende aus Mikroinjektionen erstellte Mäuse wurden untersucht.

Tier Nr.	Gewebe	Tier Nr.	Gewebe
1/68 - 6/68	Embryo	811	Schwanzspitze
72	Embryo	911	Schwanzspitze, Milz
75	Embryo	1011	Schwanzspitze, Milz
92	Embryo	1111	Schwanzspitze, Milz
101	Embryo	1211	Schwanzspitze
111	Schwanzspitze, Milz	1311	Schwanzspitze, Milz
211	Organprobe	1411	Schwanzspitze, Milz
411	Schwanzspitze	1511	Schwanzspitze, Milz
511	Schwanzspitze, Milz, Leber, Niere, Gehirn	1611	Schwanzspitze, Milz
611	Schwanzspitze, Milz, Leber, Niere, Gehirn	1711	Schwanzspitze, Milz
711	Schwanzspitze	1811	Schwanzspitze
		1911	Schwanzspitze, Milz

Weiterhin wurden folgende Nachkommen der Maus Nr. 211 untersucht.

Tier Nr.	Gewebe	Tier Nr.	Gewebe
211 - I - 1	Schwanzspitze	211 - II - 1	Schwanzspitze
211 - I - 3	Schwanzspitze	211 - II - 3	Schwanzspitze
211 - I - 4	Organprobe	211 - II - 4	Schwanzspitze
211 - I - 5	Schwanzspitze	211 - II - 6	Schwanzspitze
211 - I - 6	Schwanzspitze	211 - II - 7	Schwanzspitze
211 - I - 7	Schwanzspitze	211 - II - 8	Schwanzspitze
211 - I - 8	Schwanzspitze	211 - II - 9	Schwanzspitze
211 - I - 9	Schwanzspitze	211 - III - 1	Schwanzspitze

Folgende Nachkommen der Maus Nr. 111 wurden untersucht.

Tier Nr.	Gewebe	Tier Nr.	Gewebe
122 - 1	Schwanzspitze	235	Schwanzspitze
123 - 1	Schwanzspitze	236	Schwanzspitze
123 - 2	Schwanzspitze	237	Schwanzspitze
232	Schwanzspitze	238	Schwanzspitze
233	Schwanzspitze	239	Schwanzspitze
234	Schwanzspitze		

4.6.2 Kaninchen (Ross, 1987)

Folgende aus Mikroinjektionen erstellte Kaninchen wurden untersucht.

Tier Nr.	Gewebe	Tier Nr.	Gewebe
062/1 - 062/15	Leber	104	Schwanzspitze, Blut
023	Leber	105	Schwanzspitze, Blut
79 - 81	Schwanzspitze, Blut	26 - 28	Schwanzspitze
18/5	Schwanzspitze, Blut	29	Pfote
121	Schwanzspitze, Blut	30 - 34	Schwanzspitze
122	Schwanzspitze, Blut	35	Pfote
102	Schwanzspitze, Blut	36 - 38	Schwanzspitze
103	Schwanzspitze		

Von den Nachkommen Nr. 173-185 und Nr. 223-229 des Kaninchens Nr. 81 wurde DNA aus der Schwanzspitze gewonnen.

4.6.3 Schwein

Folgende aus Mikroinjektionen mit MThGH erstellte Schweine wurden untersucht.

Tier Nr.	Gewebe	Tier Nr.	Gewebe
1017	Schwanzspitze	643 - 4	Schwanzspitze, Ohrspitze
1203	Schwanzspitze	477 - 479	Schwanzspitze, Blut
2264 - 2269	Schwanzspitze, Blut	480 - 482	Schwanzspitze
439	Schwanzspitze, Blut	483	Schwanzspitze, Blut
440	Schwanzspitze	680 - 1	} Schwanzspitze, andere Teile des Tierkörpers
441 - 443	Schwanzspitze, Blut	680 - 2	
643 - 1	Schwanzspitze, Ohrspitze	481 - I	Schwanzspitze, Ohrspitze
643 - 2	Schwanzspitze, Ohrspitze	481 - II	Schwanzspitze, Ohrspitze
643 - 3	Schwanzspitze, Ohrspitze		

Folgende aus Mikroinjektionen mit hMTII_AMx erstellte Schweine wurden untersucht.

Tier Nr.	Gewebe	Tier Nr.	Gewebe
251 - 259	Schwanzspitze, Blut	861 - 2	Schwanzspitze
875 - 1	Schwanzspitze	861 - 3	Schwanzspitze
875 - 2	Schwanzspitze	872 - 1	Schwanzspitze
875 - 3	Schwanzspitze	863 - 1	Schwanzspitze
861 - 1	Schwanzspitze	863 - 2	Schwanzspitze

Einführung

Die Produktion transgener Tiere beginnt auf molekularbiologischer Seite mit der Klonierung geeigneter, mikroinjizierbarer Genkonstrukte. Der Aufbau der Genkonstrukte folgt der Struktur eukaryontischer Gene und besteht aus drei Grundelementen (Breathnach and Chambon, 1981). Die 5'-Region wird von einem die Expression des Gens regulierenden Teil gebildet. Dieser Bereich wird als Promotor bezeichnet und besteht seinerseits aus zwei Teilen, den 5'-flankierenden Sequenzen und der 5'-untranslatierten Region mit den Erkennungssequenzen der RNA-Polymerase II (TATA-Box, CAAT-Box) und dem Transkriptionsinitiationspunkt (vgl. dazu Kap. 6.1.1). Daran schließen sich die Sequenzen des Strukturgens an, die aus kodierenden und nicht kodierenden Bereichen bestehen (vgl. dazu Kap. 6.1.2). Im Anschluß an das Stoppcodon des Strukturgens folgt die 3'-untranslatierte Region mit den Signalen zur Polyadenylierung und korrekten Bildung eines mRNA 3'-Terminus (AATAAA, YGTGTTY; vgl. dazu Kap. 6.1.3). Die Bestandteile eines Genkonstrukts können entweder aus vorhandenen Konstrukten bzw. rekombinanten Plasmiden oder aus Gen- bzw. cDNA-Banken isoliert werden. Vor dem Einsatz für Mikroinjektionen wird die Vollständigkeit des Konstrukts durch Sequenzierung kontrolliert (vgl. dazu Kap. 5.2.8 und 6.1.4). Durch Transfektion von Kulturzellen kann *in vitro* die Transkription gezeigt werden (vgl. dazu Kap. 5.2.9 und 6.1.4). Stehen geeignete Nachweisverfahren zur Verfügung, ist es zusätzlich möglich, die Bildung funktioneller Proteine nachzuweisen.

Für die Mikroinjektion wird das Genkonstrukt mittels eines Vektors (z. B. pUC18) zunächst in Bakterien (*E. coli*) vermehrt, dann aus diesen isoliert (vgl. dazu Kap. 5.2.2) und in linearer Form präpariert (vgl. dazu Kap. 5.3). Der Nachweis transgener Tiere erfolgt mit verschiedenen Verfahren, die zum einen die Integration der Fremd-DNA, zum anderen ihre Expression nachweisen.

1. Southern Blot-Analyse (Southern, 1975; vgl. dazu Kap. 5.4)

Aus Gewebeproben eines mikroinjizierten Tieres wird zunächst genomische DNA gewonnen und mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Das dadurch entstehende DNA-Fragmentgemisch wird anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt und dann auf Nitrozellulosefilter oder Nylonmembranen übertragen. Die auf dem Trägermaterial fixierte DNA wird dann mit einer radioaktivmarkierten Probe hybridisiert und das Ergebnis durch Autoradiographie des Filters sichtbar gemacht.

2. Northern Blot-Analyse (vgl. dazu Kap. 5.2.10)

Die Expression eines mikroinjizierten Gens läßt sich durch Northern Blot-Analyse nachweisen. Hierzu wird aus Gewebeproben zytoplasmatische RNA isoliert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für die genaue Untersuchung des Integrationsorts und der Integrationsweise stehen die Verfahren der *in situ*-Hybridisierung und des genomischen Sequenzierens zur Verfügung.

5.2 Klonierung mikroinjizierbarer Genkonstrukte

5.2.1 Bakterienkultur

5.2.1.1 Flüssigkultur

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien (vgl. dazu Kap. 5.2.6) oder Isolierung von Plasmid-DNA (vgl. dazu Kap. 5.2.2) wurden Bakterien in Flüssigkulturen vermehrt.

Dazu wurde autoklaviertes L-Broth Medium mit Bakterien aus einer Glycerin-, Platten- oder anderen Flüssigkultur angeimpft und gegebenenfalls in Gegenwart eines entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

L-Broth Medium:	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
ad	1000 ml	H ₂ O bidest.

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 37 °C wurde dem Medium je nach Bedarf 50 µg/ml Ampicillin zugegeben.

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O_{bidest} (steril filtriert).

Autoklaviertes L-Broth Medium kann bei 4 °C mehrere Wochen gelagert werden.

Flüssigkulturen wurden bei 4 °C kurzfristig, zwischen 1-2 Wochen, aufbewahrt.

Wurden Flüssigkulturen mit 30 % Glycerin gemischt, konnten sie bei -20 °C mittel- bis langfristig und bei -80 °C langfristig gelagert werden.

5.2.1.2 Plattenkultur

Nach Zugabe von 15 g Bacto-Agar auf 1000 ml L-Broth Medium wurde dieses nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55 °C in sterile Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren zur Erstellung von Plattenkulturen verwendet. Durch Zusatz von Ampicillin (50 µg/ml) und X-Gal (20 µg/ml), im Fall von *E. coli* JM83 beim Klonieren mit pUC-Plasmiden, kann auf Ampicillinresistenz und β -Galactosidase Aktivität selektioniert werden.

Mittels einer sterilen Impfpöse oder Impfnadel wurden Bakterien aus einer Glycerin-, Flüssig- oder anderen Plattenkultur ausgestrichen oder punktförmig übertragen.

Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Agarplatten sind bei 4 °C, steril verpackt, mehrere Wochen haltbar.

X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Horwitz *et al.*, 1964) wurde in Dimethyl-Formamid 20 mg/ml gelöst.

Plattenkulturen wurden mit Parafilm luftdicht abgeschlossen, bei 4 °C bis zu 6 Monate mittelfristig gelagert.

5.2.2 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* JM83 und HB101

5.2.2.1 Reinigung von Plasmiden über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (nach Maniatis *et al.*, 1982)

Über CsCl-Gradienten gereinigte Plasmide wurden normalerweise aus 1000 ml Flüssigkulturen isoliert.

Bakterien einer 5 ml Übernachtskultur wurden in 1000 ml L-Broth Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte (580 nm) von 0,8 bei 37 °C im Schüttler vermehrt.

Plasmide, die unter relaxierter Kontrolle replizieren, wurden durch Zugabe von 170 µg/ml Chloramphenicol stimuliert und 20 Stunden im Schüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien im GS-3 Rotor mit 6 000 Upm bei 2-4 °C und 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde schonend in 6 ml 25 %iger Sucrose-Lösung resuspendiert, 1 ml Lysozym-Lösung und 2 ml 0,2 M EDTA pH 8,0 dazugemischt und für 5 Minuten in einem SS-34 Zentrifugenröhrchen auf Eis stehengelassen. Durch Zugabe von 8 ml Triton® X-100 Lysispuffer wurden die Bakterien auf Eis mit wiederholtem Schütteln lysiert. Die visköse Lösung wurde mit 20 000 Upm bei 2-4 °C mindestens 30 Minuten im SS-34 Rotor zentrifugiert und der klare, bernsteinfarbene Überstand mit 0,95 g CsCl/ml und 50 µl Ethidiumbromid-Lösung/ml gut gemischt. Die Plasmid-Lösung wurde dann auf 8 Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und mit 47 000 Upm bei 18 °C ungefähr 18 Stunden zentrifugiert. Danach konnte das sich in der Mitte des Zentrifugenröhrchens in Form einer Bande gesammelte Plasmid unter UV-Licht (366 nm) geerntet werden. Dazu wurden die Zentrifugenröhrchen mit einer Stativklemme befestigt und dicht unterhalb der Plasmid-Bande mit einer Kanüle durchstoßen. Danach wurde die Bande vorsichtig, ohne chromosomale DNA, mit einer Spritze abgezogen und in einem Ultrazentrifugenröhrchen gesammelt. Durch erneute 4,5 stündige Zentrifugation mit 56 000 Upm bei 18 °C wurde das Plasmid vollständig von Resten genomischer DNA oder zytoplasmatischer RNA gereinigt. Die Plasmid-Bande wurde wie beschrieben geerntet und das Ethidiumbromid mit jeweils 1 Volumen H₂O-CsCl-gesättigtem Isopropanol 2 bis 3 mal ausgeschüttelt. Die nun wasserklare Plasmid-Lösung wurde in einen ausgekochten Dialyseschlauch überführt und ungefähr 36 Stunden mit mindestens 2 bis 3 maligem Pufferwechsel gegen TE(10/1) bei 4 °C dialysiert.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption eines 1:100 bis 1:200 fach verdünnten Aliquots bei 260 nm und 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Nukleinsäuren besitzen bei 260 nm (OD₂₆₀), Proteine bei 280 nm (OD₂₈₀) ein Absorptionsmaximum. 1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg DNA/ml. Das Verhältnis OD₂₆₀ : OD₂₈₀ soll zwischen 1,8 und 2 : 1 betragen (Maniatis *et al.*, 1982).

Die Qualität des isolierten Plasmids wurde durch Restriktionsspaltung und Gel - elektrophorese kontrolliert.

25 %ige Sucrose-Lösung:	25	g	Sucrose	
	50	mM	Tris-HCl	pH 8,0
ad	100	ml	H ₂ O _{bidest.}	

Lysozym-Lösung:	5	mg	Lysozym	
	0,25	M	Tris-HCl	pH 8,0
ad	1	ml	H ₂ O _{bidest.}	

Triton® X-100 Lysispuffer:	0,2	%	Triton® X-100	
	50	mM	Tris-HCl	pH 8,0
	60	mM	EDTA	pH 8,0

TE(10/1):	10	mM	Tris-HCl	pH 7,5
	1	mM	EDTA	pH 8,0

5.2.2.2 Schnellaufschlußverfahren von Übernachtskulturen zur Plasmid-Isolierung

5.2.2.2.1 Kochschnellaufschluß

(nach Holmes and Quigley, (1981); modifiziert)

Eine rasche Untersuchung auch größerer Mengen rekombinanter Plasmide ermöglicht ein von Holmes and Quigley (1981) beschriebenes Verfahren.

Hierbei wurden Bakterien aus 5 ml Übernachtskulturen nach Zentrifugation (3 000 Upm, Raumtemperatur, 10 Minuten) in 200 µl STET-Puffer gelöst und nach Zugabe von 15 µl Lysozym-Lösung 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Kochen bei 95-100 °C im Wasserbad für genau 1 Minute wurden sämtliche Zellen lysiert und anschließend sofort auf Eis verbracht. Die Abtrennung des Zelldetritus erfolgte durch 30 minütige Zentrifugation mit 15 000 Upm bei -5 °C. Der Niederschlag wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt, der klare Überstand ethanolisch gefällt (vgl. dazu Kap. 5.3) und die Plasmid-DNA nach kurzem Trocknen in 100 µl TE(10/1) gelöst.

STET-Puffer:	8	%	Sucrose
	5	%	Triton® X-100
	50	mM	EDTA pH 8,0
	50	mM	Tris-HCl pH 8,0

Lysozym-Lösung:	10	mg	Lysozym/ml H ₂ O _{bidest.}
-----------------	----	----	--

5.2.2.2.2 Alkalischer Aufschluß

Ein nach Heinrich (1986 a) modifiziertes Verfahren zur raschen Analyse rekombinanter Plasmide mit hoher Ausbeute an mehrfach verknäulter DNA wurde von Birnboim and Doly (1979) beschrieben. Die nach dieser Methode gewonnene Plasmid-DNA eignet sich im besonderen Maße zur Doppelstrang - sequenzierung.

Bakterien wurden bei 37 °C über Nacht in 5 ml Flüssigkultur im Schüttler vermehrt. Die Kulturen wurden auf 0 °C im Eiswasserbad abgekühlt und mit 3 000 Upm bei 4 °C ungefähr 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Abgießen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 2,5 ml eiskaltem TNE-Puffer resuspendiert und wie oben abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lysozym-Lösung aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter SDS-Lösung und vorsichtigem Mischen wurde sofort 150 µl Natriumacetat-Puffer hinzu pipettiert und der Ansatz 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Der Inhalt wurde dann in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt und 5 Minuten mit 15 000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Der vorsichtig abpipettierte Überstand wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt, kurz abzentrifugiert (15 000 Upm, 5 Minuten) und mit 2 Volumen Ethanol 5 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend im Vakuum getrocknet und zur Spaltung der RNA zunächst in 100 µl TE(10/1) gelöst, dann mit 1 µl RNase-Lösung versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte nun eine erneute Extraktion der Plasmid-DNA nach Zugabe von 40 µl Natriumacetat-Puffer und 260 µl H₂O_{bidest.} mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und nachher 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Zuletzt wurde die DNA mit 2 Volumen absolutem Ethanol (eiskalt) bei -80 °C gefällt, abzentrifugiert (15 000 Upm, -5 °C, 30 Minuten), mit 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz im Vakuum getrocknet und in 20 µl TE(10/1) gelöst.

Ausbeuten bei diesem Verfahren lagen üblicherweise bei 10 bis 20 µg Plasmid-DNA.

Lysozym-Lösung (5 mg/ml):	50 mM Glucose (sterilfiltriert)	
	50 mM Tris-HCl	pH 8,0
	10 mM EDTA	pH 8,0

SDS-Lösung:	1 % SDS in 0,2 M NaOH
Natriumacetat-Puffer:	3 M Natriumacetat pH 4,8
RNase-Lösung (10 mg/ml):	10 mg/ml RNase A 10 mM Tris-HCl pH 7,5 15 mM NaCl (20 Minuten bei 95 °C kochen, abkühlen lassen und bei -20 °C aliquotiert aufbe- wahren)
TNE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA

5.2.3 Abspaltung von 5'-Phosphatresten mit alkalischer Phosphatase

Mit Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA besitzt 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen. Durch die alkalische Phosphatase werden 5'-Phosphatreste entfernt und so die unerwünschte Rezirkularisierung des Vektors in einer Ligase-Reaktion verhindert.

Exogene DNA, die noch 5'-Phosphatreste besitzt, kann dagegen unter Ausbildung von zwei der vier möglichen Phosphodiesterbindungen ligiert werden und ein rekombinantes Plasmid bilden.

Für einen Standardreaktionsansatz (20 µl) wurden zunächst bis zu 5 µg Vektor-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert und vor der Behandlung mit alkalischer Phosphatase ethanolisch gefällt. Danach wurden folgende Reaktionsbestandteile hinzu pipettiert:

(1)	1/20 Volumen	20 x RAP-Puffer
(2)	1 U/µg DNA	alkalische Phosphatase
(3)	ad 20 µl	H ₂ O _{bidest.}

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C 30-60 Minuten inkubiert.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde dann für 15 Minuten bei 65 °C weiter - inkubiert und vor der Phenolextraktion der Ansatz mit TE(10/1) auf 300 µl aufgefüllt.

Die phenolisierte Probe wurde erneut mit Ethanol gefällt und die DNA für weitere Experimente in 20 µl TE(10/1) resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

20 x RAP-Puffer:	1 M	Tris-HCl	pH 8,0
	2 mM	EDTA	pH 8,0

5.2.4

Auffüllung von 5'-versetzten Enden mit dem Klenow-Fragment oder T4 DNA-Polymerase und Abspaltung 3'-versetzter Enden mit T4 DNA-Polymerase

Bei der Hydrolyse von DNA entstehen bei den meisten Restriktionsendonukleasen 5'- bzw. 3'-versetzte Enden.

Um beliebige, auch nichtüberlappende Fragmentenden mit T4 DNA-Ligase verknüpfen zu können, müssen versetzte Enden in glatte überführt werden. 5'-versetzte DNA-Fragmentenden werden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt (Telford *et al.*, 1979). Hierzu wurde 1 µg gesplante DNA in einem 20 µl Reaktionsansatz mit

(1)		4 µl	5 x Klenow-Puffer
(2)		1 U	Klenow-Fragment (1U/µl)
(3)	ad	20 µl	H ₂ O _{bidest.}

versetzt und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde anschließend zunächst für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und dann eine Phenolextraktion (vgl. dazu Kap. 5.2.2.2.2) vorgenommen. Nach der Fällung der DNA mit Ethanol wurde der DNA-Niederschlag in 10 µl TE(10/1) resuspendiert.

5 x Klenow-Puffer:	250 mM	Tris-HCl	pH 7,5
	200 mM	K ₂ HPO ₄	pH 7,5
	50 mM	MgCl ₂	
	5 mM	DTT	
je	0,1 mM	dNTP	

3'-versetzte Enden lassen sich durch T4 DNA-Polymerase in glatte überführen. Die T4 DNA-Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonuklease- und 5'→3'-Polymeraseaktivität. In einem Standardreaktionsansatz (20 µl) waren enthalten

(1)		1 µg	gespaltene DNA
(2)		4 µl	5 x T4-Polymerase-Puffer
(3)		1 U	T4 DNA-Polymerase (1U/µl)
(4)	ad	20 µl	H ₂ O _{bidest.}

Alle Reaktionsbestandteile wurden bei Raumtemperatur gemischt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die weitere Aufbereitung erfolgte wie oben beschrieben.

5 x T4-Polymerase-Puffer:	335 mM	Tris-HCl	pH 8,8
	33,5 mM	MgCl ₂	
	50 mM	DTT	
	33,5 µM	EDTA	pH 8,0
	83 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	835 µg/ml	BSA (Fraktion V)	
je	0,2 mM	dNTP	

5.2.5 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

Die Verknüpfung von linearer, dephosphorylierter Plasmid-DNA mit exogenen DNA-Fragmenten erfolgte mit T4 DNA-Ligase nach einer von King und Blakesley (1986) modifizierten Vorschrift von Weiss *et al.* (1968). Dieses Verfahren eignet sich sowohl für die Ligation glatter als auch überstehender DNA-Enden.

Zunächst wurde das optimale molare Verhältnis zwischen Vektor- und Insertions-DNA nach Dugaiczky *et al.* (1975) ermittelt und die Ligation in 20 µl nach folgendem Schema erstellt:

(1)		x ng	Vektor-DNA
(2)		y ng	Insertion-DNA
(3)		4 µl	5 x Ligase-Puffer
(4)		2 U	T4 DNA-Ligase
(5)	ad	20 µl	H ₂ O _{bidest.}

Alle Reaktionsbestandteile wurden zusammen pipettiert und ungefähr 16 Stunden (über Nacht) bei 14-16 °C im Wasserbad inkubiert.

5 x Ligase-Puffer:	250 mM	Tris-HCl pH 7,6
	50 mM	MgCl ₂
	25 %	PEG 8 000
	5 mM	ATP
	5 mM	DTT

5.2.6 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* JM83 und HB101

E. coli JM83 (für Transformationen mit pUC-Plasmiden) und HB101 (für Transformationen mit pBR-Plasmiden) müssen, um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, kompetent gemacht werden. Das hier beschriebene Verfahren lehnt sich an die Arbeiten von Cohen *et al.* (1972) und Maniatis *et al.* (1982) an.

200 ml 37 °C warmes L-Broth Medium wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer A₅₈₀ = 0,5 im Schüttler vermehrt. Die Bakterienkultur wurde dann rasch im Eis-Salzwasserbad auf 0 °C abgekühlt und in vorgekühlten GS-A Rotorbechern mit 8 000 Upm bei 2-4 °C 10 Minuten zentrifugiert.

Der Bakterienniederschlag wurde vorsichtig in 50 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert, in ein 50 ml Falcon®-Röhrchen überführt und mit 2 500 Upm bei 2-4 °C 15 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet, in 50 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung gelöst, bei 0 °C 20 Minuten inkubiert.

Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation der Bakterien. Zuletzt wurden die Bakterien, in 10 ml 0,1M CaCl₂-Lösung und 20 % Glycerin resuspendiert und in 200 µl Fraktionen aliquotiert, bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

5.2.6.1 Transformation kompetenter *E. coli* JM83 und HB101

Die Transformation kompetenter *E. coli* JM83 oder HB101 mit rekombinanter oder Wildtyp Plasmid-DNA erfolgte nach einer Methode von Hanahan (1983). Hierzu wurden 200 µl kompetente Bakterien, welche entweder frisch hergestellt oder im Eiswasserbad bei 0 °C aufgetaut wurden, mit 5 ng Wildtyp Plasmid-DNA oder 10-200 ng ligierter DNA auf Eis 1 Stunde inkubiert.

Nach einem exakt 2 minütigen Hitzeschock bei 42 °C wurde den Zellen 1 ml 37 °C warmes L-Broth Medium zugesetzt und der Transformationsansatz bei 37 °C ungefähr 1 Stunde leicht geschüttelt.

Je nach eingesetzter DNA-Menge wurden angemessene Aliquots auf L-Broth Agarplatten mit Zusatz von Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.7 Nachweis rekombinanter Plasmide durch Kolonie-Hybridisierung

Eine große Anzahl rekombinanter Klone lassen sich rasch durch Kolonie-Hybridisierung (Grunstein and Hogness, 1975) überprüfen.

Hierbei wurden die nach Transformation erhaltenen Klone mit einem Raster geordnet auf eine neue Agarplatte übertragen und bei 37 °C im Brutschrank bis zu Stecknadelkopfgröße vermehrt. Durch Auflegen eines Nitrozellulosefilters auf die Agarplatte wurden sämtliche Kolonien abgeklatscht und der nach wenigen Sekunden vollständig durchfeuchtete Filter (Kolonien nach oben) auf drei Lagen mit einer 10 %igen SDS-Lösung getränktem 3MM Whatman Papier luftblasenfrei gelegt. Nach 5 Minuten wurde der Filter zur Denaturierung auf drei Lagen mit Denaturierungspuffer getränktem 3MM Whatman Papier und nach 10-20 Minuten zur Neutralisierung auf in gleicherweise mit Neutralisierungspuffer vorbereitetem 3MM Whatman Papier übertragen. 10 Minuten später wurde der Filter für 5 Minuten mit 2 x SSC benetzt und anschließend 15 Minuten in 50 ml TESP-Puffer bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Filter wurde dann bei Raumtemperatur getrocknet, 2 Stunden bei 80 °C gebacken und, wie in 5.4.5 beschrieben, vorhybridisiert und hybridisiert.

Denaturierungspuffer:	0,5 M	NaOH	
	1,5 M	NaCl	
Neutralisierungspuffer:	0,5 M	Tris	
	1,5 M	NaCl	
		pH 5,5	
TESP-Puffer:	10 mM	Tris-HCl	pH 7,5
	1 mM	EDTA	pH 8,0
	0,5 %	SDS	
	20 µg/ml	Proteinase K	

5.2.8 Sequenzierung doppelsträngiger DNA nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde streng nach dem in Anlehnung an Sanger *et al.* (1977), Smith *et al.* (1979) und Wallace *et al.* (1981) von Heinrich (1986 a, b) entwickelten Protokoll durchgeführt.

Dies ermöglicht die Sequenzierung rekombinanter Plasmid-DNA aus Präparationen von 5 ml Übernachtskulturen (vgl. dazu Kap. 5.2.2.2.2).

Am besten eignen sich pUC-Plasmide in *E. coli* JM83 zur Sequenzierung, da diese hohe Ausbeuten an mehrfach verknäulter DNA liefern, die entscheidend für die Qualität und Lesbarkeit einer Sequenz ist.

Die Sequenzreaktion erfolgte in drei Schritten:

1) 2 µg der aus Übernachtskulturen isolierten Plasmid-DNA (vgl. dazu Kap. 5.2.2.2.2) wurden im Vakuum getrocknet, in 40 µl Denaturierungspuffer aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl Ammoniumacetat-Puffer wurde die DNA mit 100 µl absolutem Ethanol (-20 °C) versetzt und 5 Minuten bei -80 °C präzipitiert.

Durch Zentrifugation (15 000 Upm, -5 °C, 30 Minuten) wurde die DNA pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

2) Im Folgenden wurde ein spezifisches Oligonukleotid ("Primer") in einer Hybridisierungsreaktion an die Plasmid-DNA gebunden ("Primer-Annealing"). Die denaturierte DNA wurde dazu mit

(1)	2 µl	Oligonukleotid-"Primer" (2,5 pmol/µl)
(2)	1,5 µl	10 x Annealingpuffer
(3)	2 µl	[α- ³⁵ S]thiodATP (650 Ci/mmol)
(4)	ad 15 µl	H ₂ O _{bide} st.

versetzt und 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

3) Im dritten Schritt erfolgte die eigentliche Sequenzreaktion. Die "Annealing"-Reaktion wurde zunächst mit 1 µl Klenow-Fragment (2U) gemischt und dann jeweils 3 µl zu 2 µl einer dNTP/ddNTP-Mischung pipettiert, gut gemischt und bei 37 °C inkubiert.

Nach 20 Minuten wurde in jeden Reaktionsansatz 1,5 µl "Chase"-Lösung gegeben und die Inkubation 15 Minuten weitergeführt.

Abschließend wurden alle Reaktionen im Vakuum getrocknet und in 4 µl Formamid-Auftragspuffer gelöst.

Vor dem Auftragen auf das Sequenzgel mußten die Proben 3 Minuten bei 100 °C hitzedenaturiert und dann sofort auf Eis abgeschreckt werden. Jeweils 1 µl wurde auf das Gel aufgetragen.

Denaturierungspuffer: 0,2 M NaOH
 0,2 mM EDTA pH 8,0

Ammoniumacetat-Puffer: 2 M Ammoniumacetat pH 4,5

10 x Annealingpuffer: 70 mM Tris-HCl pH 7,5
 70 mM MgCl₂
 300 mM NaCl
 100 mM DTT
 1 mM EDTA pH 8,0

"Chase"-Lösung: 0,125 mM eines jeden dNTP

Formamid-Auftragspuffer: 98 % Formamid (entionisiert)
 10 mM EDTA pH 8,0
 0,2 % BPB
 0,2 % Xylencyanol

Nukleotid	A - Mix µM	C - Mix µM	G - Mix µM	T - Mix µM
dTTP	100	100	100	5
dCTP	100	10	100	100
dGTP	100	100	5	100
ddGTP	—	—	120	—
ddCTP	—	100	—	—
ddATP	100	—	—	—
ddTTP	—	—	—	500

Tab. 1 : dNTP/ddNTP-Mischungen
(Schema in Anlehnung an Heinrich, 1986 a)

Die dNTP/ddNTP-Mischungen wurden in 1 x Annealingpuffer gelöst und in 2 µl Fraktionen bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Sequenzierung mit pUC-Plasmiden wurden folgende "Primer" verwendet :

- Universal-Primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

- Reverser Primer: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

5.2.8.1 Polyacrylamid-Sequenzgelelektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen Sequenzreaktionen erfolgte auf keilförmigen, 0,1 mm (Auftragsstelle) bis 0,4 mm (Ende) dicken, denaturierenden 5 %-Polyacrylamid-Harnstoffgelen.

Sequenzgele wurden auf einer Macrophor™(LKB) Apparatur folgendermaßen präpariert.

1. Haftplatte (obere Glasplatte):

5 ml Bindsilanlösung (18,7 µl γ-(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilane und 187,5 µl 10 %ige Essigsäure in 5 ml absolutem Ethanol) wurden gleichmäßig auf die vorher gründlich gereinigte Glasplatte verteilt, 5 Minuten getrocknet und poliert. Anschließend wurde die Platte wie oben mit 5 ml absolutem Ethanol behandelt.

2. Thermostatisierplatte:

Nach gründlicher Reinigung der Platte wurde diese je zweimal mit 5 ml 5 %-Dimethyldichlorosilan-Lösung beschichtet und nach 5 minütigem Eintrocknen poliert.

3. Durch Einlegen von 10, 20, 30 und 60 cm langen, 0,1 mm dicken "Spacer" zwischen die beiden Glasplatten wurde ein keilförmiger Hohlraum geschaffen. In diesen wurde das Gel in horizontaler Lage gegossen und 2 Stunden polymerisiert.

Vor dem Auftrag der Sequenzreaktionen wurde das Gel bei 2 000 V und etwa 20 mA für 30 Minuten in 1 x TBE-Puffer vorelektrophoresiert und dann bei

2 500-3 000 V, maximal 30 mA, maximal 80 Watt und 65 °C die eigentliche Elektrophorese für ungefähr 1,5-2 Stunden durchgeführt.

Nachdem die BPB-Front bis zum Ende der Haftplatte gelaufen war, wurden die beiden Platten voneinander getrennt und das der oberen Glasplatte anhaftende Gel zur Fixierung und Entfernung des Harnstoffs in 10 %iger Essigsäure für 15 Minuten geschwenkt, danach mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ abgespült und für mindestens 1 Stunde bei 80 °C getrocknet.

Es wurde dann zur Autoradiographie mit einem gleichgroßen Röntgenfilm belegt, mit einer Druckplatte beschwert und in Aluminiumfolie lichtundurchlässig für 1 bis 2 Tage bei Raumtemperatur exponiert.

5 %-PAA Gel-Lösung: 84 g Harnstoff
 9,5 g Acrylamid krist.
 0,5 g N,N'-Methylenbisacrylamid
 20 ml 10 x TBE-Puffer
 ad 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Die fertige Gel-Lösung wurde vor Gebrauch durch einen 0,45 µm Membranfilter (Millipore™) filtriert und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Für ein Gel wurden durchschnittlich 50 ml 5 %-PAA Gel-Lösung mit 300 µl 10 %iger APS-Lösung und 20 µl TEMED gemischt.

10 x TBE Puffer: 121,1 g Tris
 51,35 g Borsäure
 3,72 g EDTA
 ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

10 %ige APS-Lösung: 0,5 g Ammoniumperoxodisulfat
 in 5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

5.2.9 Zellkultur

5.2.9.1 Züchtung von BHK-Zellen in Monolayerkulturen

Hamsternierenzellen (BHK tk-ts13) wurden im CO_2 /Luftgemisch (5 % CO_2) bei 37 °C in mit Dulbecco's Medium (Dulbecco and Freeman, 1959) und 5 % Serum von neugeborenen Kälbern gefüllten Plastikzellkulturflaschen

(Nunc, 80 cm²) als Einschicht-Zellrasen kultiviert. Nachdem der Zellrasen dicht gewachsen war, wurde das Medium abgegossen, einmal mit 5-10 ml PBS-d (37 °C) gespült und 1 ml Trypsin-Lösung gleichmäßig über die Zellen verteilt.

Nach kurzer Inkubation bei 37 °C konnten die Zellen durch Klopfen an der Kulturflasche gelöst und durch Zugabe von 5 ml Medium mit Serum vor weiterer Trypsinierung geschützt werden.

1-1,5 ml dieser Zellsuspension wurden dann auf Petrikulturschalen verteilt, mit Dulbecco's Medium (5 % Serum von neugeborenen Kälbern) überschichtet und die Zellen bei 37 °C bis zu mäßiger Dichte vermehrt.

Dulbecco's Medium: vgl. dazu Dulbecco and Freeman (1959)

PBS-d:	40	g	NaCl
	1	g	KCl
	7.21	g	Na ₂ HPO ₄
	1	g	KH ₂ PO ₄
ad	5000	ml	H ₂ O _{bidest.}

5.2.9.2 Transfektion von BHK-Zellen nach der Ca-Phosphat-Methode

Zur Transfektion von BHK-Zellen wurde das von Graham and van der Eb (1973) und Pellicer *et al.* (1978) beschriebene Verfahren verwandt.

3-4 Stunden vor der Transfektion wurden die in Petrikulturschalen gewachsenen Zellen mit 25 ml Dulbecco's Medium und 10 % fetalem Kälberserum überschichtet.

Währenddessen wurden 30 µg der zu transfizierenden DNA in TE(10/1) und 250 mM CaCl₂ auf ein Endvolumen von 750 µl verdünnt. Anschließend wurde die DNA/CaCl₂-Lösung unter ständigem Schütteln langsam in 750 µl im Reaktionsröhrchen vorgelegten 2 x HBS-Puffer getropft und die Bildung eines Calciumphosphat-Niederschlags abgewartet.

Das Präzipitat wurde dann auf die Zellen verbracht und der Transfektionsansatz für 3-4 Stunden ruhen gelassen. In dieser Zeit sedimentieren die DNA-Calciumphosphatkristallkomplexe auf die Zellen und haften diesen an.

Das Medium wurde nun vorsichtig abgesaugt, 2 ml 20 % Glycerin wurden in 1 x HBS-Puffer über die Zellen verteilt und 3 Minuten bei 37 °C im Brutschrank und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden

10 ml Medium zugegeben, gemischt, abgesaugt und erneut mit 10 ml Medium gewaschen.

Nach Zugabe von 35 ml Dulbecco's Medium und 5 % fetalem Kälberserum wurden die Zellen 30 Stunden im Brutschrank belassen.

2 x HBS-Puffer:	280 mM	NaCl
	50 mM	Hepes
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
mit	1 M	NaOH pH 7,15 einstellen.

5.2.10 Isolierung zytoplasmatischer RNA aus der Zellkultur

Zytoplasmatische RNA wurde durch Anwendung einer aus mehreren Verfahren (Glisin *et al.*, 1974; Chirgwin *et al.*, 1979; Maniatis *et al.*, 1982) kombinierten Methode aus BHK-Zellen isoliert.

Ungefähr 30 Stunden nach erfolgter Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS-d gewaschen, dann sofort mit 6 ml Guanidiniumthiozyanat-Puffer überschichtet und nach der Lyse mit einem Gummischaber von der Platte gewischt. Zellen von jeweils drei Platten wurden vereinigt.

Zur Trennung der RNA von den restlichen zellulären Bestandteilen wurde eine CsCl-Stufengradientenzentrifugation vorgenommen.

Hierzu wurden 3 ml CsCl-Lösung (19 g CsCl/20 ml TE(10/1)) als Kissen in ein steriles Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 6 ml des Lysats überschichtet und im Schwenkbecherrotor mit 36 000 Upm bei 18 °C mindestens 18 Stunden zentrifugiert. Dabei sammelt sich die RNA durch das Kissen hindurch am Boden des Zentrifugenröhrchens, während alle anderen zellulären Bestandteile sich an den Phasengrenzen sammeln. Nach Absaugen des Überstandes wurde die RNA in 300 µl TES-Puffer gelöst, jeweils zweimal mit 1 Volumen Chloroform/n-Butanol (4:1) extrahiert und die organische Phase erneut mit 200 µl TE(10/1) reextrahiert.

Mit 1/10 Volumen 3,0 M Natriumacetat pH 5,2 und 2 Volumen absolutem Ethanol wurde die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt und nach der Zentrifugation (15 000 Upm, -5 °C, 30 Minuten) mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Sie konnte dann in TE(10/1) gelöst und entweder zur Konzentrationsbestimmung bei 260 nm photometriert (1 OD₂₆₀ = 40 µgRNA/ml), für

die Gelelektrophorese denaturiert oder für spätere Versuche im gefällten Zustand bei -20 °C aufbewahrt werden.

TES-Puffer:	10 mM Tris-HCl	pH 7,5
	1 mM EDTA	pH 8,0
	1 % SDS	

Guanidiniumthiozyanat-Puffer:

4 M	Guanidiniumthiozyanat	
0,5 %	N-Lauroylsarkosin	35 %
	Natriumsalz	
25 mM	Natriumacetat	pH 7,0
0,1 M	β -Mercaptoethanol	
0,1 %	Sigma 30 % Antifoam A	

5.2.10.1 Gelelektrophorese von RNA in Formaldehyd-Gelen (nach Maniatis *et al.*, 1982)

Zur Auftrennung von RNA-Molekülen wurden denaturierende Formaldehyd-Flachgele verwandt.

Um das während der Gelelektrophorese im Laufpuffer auftretende pH-Gefälle auszugleichen, wurde der Puffer von der Anode zur Kathode umgepumpt, so daß er über das Gel zurückfließen konnte.

Üblicherweise wurden 1,4 %ige Formaldehyd-Agarosegele in der Weise hergestellt, daß die Agarose in $\frac{1}{5}$ Volumen 5 x MOPS-Laufpuffer und einem entsprechenden Anteil an $H_2O_{\text{bidest.}}$ autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 60 °C mit Formaldehyd (Endkonzentration: 2,2 M) versetzt wurde.

Das Gel wurde dann in einer dafür präparierten Flachgel-Apparatur, die über Nacht in SDS eingelegt worden war, gegossen.

Vor dem Auftragen wurden die RNA-Proben (20-30 μg) in

- | | |
|-----|--|
| (1) | 4,5 μl $H_2O_{\text{bidest.}}$ |
| (2) | 2,0 μl 5 x MOPS-Laufpuffer |
| (3) | 3,5 μl Formaldehyd |
| (4) | 10,0 μl Formamid (entionisiert) |

gelöst, 20 Minuten bei 60 °C (Lehrach *et al.*, 1977) denaturiert und mit 2 μl 10 x Auftragspuffer gemischt.

Die Gelelektrophorese wurde bei 80-100 V durchgeführt.

5 x MOPS-Laufpuffer: 0,2 M 3-(N-Morpholino)propansulfon-
säure pH 7,0
50 mM Natriumacetat
5 mM EDTA pH 8,0

10 x Auftragspuffer: 50 % Glycerin
1 mM EDTA
0,4 % BPB
0,4 % Xylencyanol

5.2.10.2 Übertragung von RNA auf Nitrozellulosefilter (Northern Blot)

Die Übertragung von RNA auf Nitrozellulosefilter erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wie unter 5.4.3 für DNA beschrieben, mit folgenden Änderungen:

1. Das Gel wurde vor dem Transfer nicht denaturiert oder angefärbt.
2. Die Transferzeit betrug zwischen 2-3 Tagen und wurde bei 4 °C durchgeführt.
3. Die Nitrozellulosefilter wurden nach dem Transfer nicht in 6 x SSC gewaschen (Thomas, 1980), sondern gleich bei 80 °C im Trockenschrank gebacken.

Die fertigen Filter wurden dann wie unter 5.4.5 weiterbehandelt.

5.3 Isolierung und Reinigung mikroinjizierbarer DNA-Fragmente

DNA-Lösungen für Mikroinjektionen müssen absolut frei von Verunreinigungen sein, da diese zur Verstopfung der Injektionspipette und Schädigung der injizierten Zygoten führen können. Deshalb müssen neben den üblichen Isolierungsverfahren besondere Reinigungsschritte angewendet werden:

- Sämtliche Lösungen, die zur Herstellung einer Injektionslösung verwendet werden, müssen vorher sterilfiltriert werden.
- Eppendorfgefäße werden vor dem Gebrauch mit sterilfiltriertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült und getrocknet.

5.3.1 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen mit DEAE-Zellulosemembranen

Ein nach Restriktionsspaltung entstandenes DNA-Fragmentgemisch, bestehend aus Vektor- und Insertions-DNA, wurde durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach ausreichender Trennung wurde das gewünschte Fragment mit einer DEAE-Zellulosemembran (Schleicher & Schuell) aus dem Gel isoliert (Winberg and Hammerskjöld, 1980).

Dazu wurde mit einem Skalpell unmittelbar vor (in Laufrichtung) der im langwelligen UV-Licht (366 nm) sichtbargemachten DNA-Bande ins Gel geschnitten und ein Stück zuvor aktivierte DEAE-Zellulose eingeführt. Die Aktivierung der Membran erfolgte durch Waschen in 10 mM EDTA pH 7,6 für 10 Minuten in 0,5 M NaOH für 5 Minuten und mehrmals in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$. Die so behandelten Membranen sind bei 4 °C in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ mehrere Wochen haltbar.

Danach wurde die Gelelektrophorese so lange weitergeführt, bis die zu isolierende DNA an der Membran gebunden war.

Durch gründliches Waschen mit NET-Puffer wurden die der Membran anhaftenden Agaroseteilchen entfernt und die Elution der gebundenen DNA durch Übersichten mit NET-Hochsalzpuffer und Inkubation bei 65 °C unter wiederholtem Schütteln, zweimal jeweils 30 Minuten, durchgeführt.

Anschließend wurde das DNA-Eluat zur Extraktion des Ethidiumbromids mit 3 Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ -gesättigtem-n-Butanol ausgeschüttelt, $\frac{1}{10}$ Volumen 3,0 M Natriumacetat pH 5,2 zugeetzt und durch Zugabe von 2,5 Volumen absolutem Ethanol bei -80 °C für 30 Minuten gefällt.

Die abzentrifugierte DNA (15 000 Upm, -5 °C, 30 Minuten) wurde dann mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in TE(10/1) gelöst.

NET-Puffer: 0,15 M NaCl
 0,1 mM EDTA pH 8,0
 20 mM Tris-HCl pH 8,0

NET-Hochsalzpuffer: 1 M NaCl
 0,1 mM EDTA pH 8,0
 20 mM Tris-HCl pH 8,0

5.3.2 DNA-Fragmentisolierung aus niedrigschmelzender Agarose

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus niedrigschmelzender Agarose ist zwar aufwendiger als das oben beschriebene Verfahren, führt jedoch zu DNA-Präparationen höherer Reinheit.

Nach der Auftrennung der gespaltenen DNA in 0,8 %iger niedrigschmelzender Agarose wurde die zu isolierende DNA-Bande unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten, mit einem gleichen Anteil 0,6 M Natriumacetat pH 6,0 versetzt und zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur, dann 3 Minuten bei 68 °C und anschließend 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 Volumen bei 37°C vorgewärmten TE-gesättigten Phenol zur 0,3 M Natrium - acetat/DNA-Lösung wurde der Ansatz extrahiert und nach kurzer Zentrifugation der Überstand zur Phenol/Chloroformextraktion in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Nach diesem Schritt wurde die phenolische Phase entfernt und die wäßrige DNA-haltige Phase mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol präzipitiert. Zur vollständigen Reinigung erfolgte dann eine Elution der nach der Fällung in TE(10/1) resuspendierten DNA über eine Sephacryl 6B-Säule. Diese war zuvor in einer im Konus mit einer sterilen Glasperle abgedichteten Pasteurpipette vorbereitet worden.

Die mit TNE-Puffer eluierten 200 µl Fraktionen, die die DNA enthielten, wurden vereinigt.

TNE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,5
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA pH 8,0

5.3.3 Reinigung und Verdünnung isolierter DNA-Fragmente

Ein Aliquot der nach den oben beschriebenen Verfahren isolierten DNA-Fragmente wurde zur Bestimmung des DNA-Gehalts 1:100 mit H₂O_{bidest.}

verdünnt und im Spektralphotometer die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Danach konnten die Lösungen mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5/ 0,2 mM EDTA pH 8,0 so verdünnt werden, daß in 1 µl Injektionslösung zwischen 500 und 1 000 Kopien des Genkonstrukts enthalten waren. Die fertigen Injektionslösungen wurden anschließend nochmal 30 Minuten bei Raumtemperatur und 15 000 Upm zentrifugiert und in neue mit sterilfiltriertem H₂O_{bidest.} gespülte Eppendorfgeläße überführt.

Vor der Injektion wurde ein Auslaufetest vorgenommen. Wenn dabei die Injektionspipette verstopften, wurde die Reinigung wie oben wiederholt. Die so präparierten DNA-Lösungen konnten üblicherweise ohne Probleme injiziert werden. Die Injektionslösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

5.4 Nachweis transgener DNA-Sequenzen in mikroinjizierten Tieren

5.4.1 Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA aus Geweben und/oder Blut

5.4.1.1 Zerpulverung großer Gewebeproben in flüssigem Stickstoff

Die erfolgreiche Analyse eukaryontischer DNA ist entscheidend von dem durchschnittlichen Molekulargewicht der isolierten DNA abhängig.

Größere Gewebeproben wurden deshalb nach einem modifizierten Verfahren von Blin and Stafford (1976) bearbeitet. Die mit dieser Methode gewonnene DNA hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 200×10^6 D und enthält, wenn überhaupt, äußerst wenige Einzelstrangbrüche (Blin and Stafford, 1976).

Frisch entnommene Gewebeproben wurden in Aluminiumbriefchen mit wiederholtem Eintauchen in flüssigen Stickstoff vollständig zerpulvert. Das Gewebepulver wurde in einen Natriumsarkosyl/EDTA/Proteinase K-Lysispuffer überführt und mit 200 Upm bei 50 °C zwischen 2-3 Stunden im Wasserbadschüttler inkubiert.

Die weitere Aufbereitung des Lysats erfolgte, wie unter 5.4.1.4 beschrieben.

Lysispuffer:	0,5 M	EDTA
	0,5 %	N-Lauroylsarkosin 35 % Natriumsalz
	100 µg/ml	Proteinase K
		pH 8,0

Proteinase K-Stammlösung: 20 mg/ml in H₂O_{bdest.}

5.4.1.2 Aufbereitung kleiner Gewebeproben im Proteinase K-Lysispuffer

Sehr kleine Gewebeproben wurden nicht in flüssigem Stickstoff zerpulvert, sondern direkt in einem Proteinase K-Lysispuffer verdaut. Mit diesem Verfahren läßt sich aus einem 1-2 cm langen Stück der Schwanzspitze einer Maus bis zu 300 µg hochmolekulare DNA isolieren.

Das Gewebe wurde in 735 µl Proteinase K-Lysispuffer bei 55 °C 8-18 Stunden inkubiert. Bei sehr kleinen Proben konnte man schon nach 5 Stunden eine vollständige Lysis des Gewebes feststellen.

Nach vollständiger Verdauung der Gewebeproben wurden die hochviskösen Lysate in 10 ml Reaktionsröhrchen überführt und, wie in 5.4.1.4 beschrieben, weiter aufbereitet.

Proteinase K-Lysispuffer:	50 mM	Tris-HCl	pH 8,0
	100 mM	NaCl	
	100 mM	EDTA	pH 8,0
	1 %	SDS	
	0,5 mg/ml	Proteinase K	

Proteinase K-Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O_{bdest.}

Die Proteinase K-Stammlösung wurde direkt vor der Inkubation in der angegebenen Konzentration dem Lysispuffer zugesetzt.

5.4.1.3 Anreicherung von Lymphozyten zur DNA-Isolierung im Ficoll-Paque™ Gradienten (nach Angaben des Herstellers)

Bei Schweinen und Kaninchen wurde neben den oben beschriebenen DNA-Isolierungsverfahren auch die *in vitro*-Isolierung von Lymphozyten zur DNA-Gewinnung verwandt (Fotino *et al.*, 1971).

Mindestens 5 ml Blut wurden mit einem gleichen Volumen BS-Lösung gemischt und auf ein 4 ml Ficoll-Paque™ Kissen im Reaktionsröhrchen vorsichtig, ohne die beiden Phasen zu mischen, geschichtet.

Durch Zentrifugation mit 2 200 Upm bei Raumtemperatur für 40 Minuten in einer LabofugeII (Christ) sammelten sich die Lymphozyten und Thrombozyten an den Phasengrenzen, während Erythrozyten und Granulozyten pelletierten. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Lymphozyten mit einer Pasteur - pipette abgezogen und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Anschließend wurden 735 µl Proteinase K-Lysispuffer (vgl. dazu Kap. 5.4.1.2) zugegeben und die DNA nach 3-4 Stunden Inkubation bei 55 °C isoliert.

Lösung A:

0,1	%	D-Glucose
0,05	mM	CaCl ₂ • 2 H ₂ O
0,98	mM	MgCl ₂ • 6 H ₂ O
5,4	mM	KCl
0,145	M	Tris
		pH 7,6

Lösung B: 0,14 M NaCl

Lösung BS:

Zur Herstellung der Lösung BS wurden 1 Volumen Lösung A mit 9 Volumen Lösung B gemischt.

Die Lösung BS wurde jedesmal frisch angesetzt.

5.4.1.4 Reinigung und Konzentrationsbestimmung

Die nach 5.4.1.1/2/3 aufbereiteten Proben wurden nach der Inkubation mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) zweimal jeweils 30 Minuten extrahiert. Die wäßrige, obere und intermediäre Phase wurde nach einer 10 minütigen Zentrifugation mit 3 000 Upm bei Raumtemperatur abgenommen und erneut mit 1 Volumen CIA zweimal jeweils 15 Minuten ausgeschüttelt. Zur Fällung wurde die klare, nukleinsäurehaltige, wäßrige Phase mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3,0 M Natriumacetat pH 6,0 und 1 Volumen eiskaltem Isopropanol gemischt und 5-10 Minuten bei -80 °C präzipitiert. Das Präzipitat wurde nach der Zentrifugation (15 000 Upm, -5 °C, 30 Minuten) in 300 µl TE(10/1) resuspendiert und wie unter 5.3.1 mit absolutem Ethanol erneut gefällt. Ein 1:100 oder 1:200 in H₂O_{bidest.} verdünntes Aliquot wurde zur Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer herangezogen.

CIA: Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

5.4.2

Hydrolyse hochmolekularer, genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen und Agarose-Gelelektrophorese

Zur Spaltung wurden 20-30 µg hochmolekulare, genomische DNA verwandt und mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut.

Je nach Konzentration der DNA mußte vorher nochmals eine Fällung (vgl. dazu Kap. 5.3.1) durchgeführt werden. DNA-Lösungen mit ausreichender optischer Dichte konnten direkt zur Spaltung hergenommen werden. Ein Standardreaktionsansatz enthielt:

- | | | |
|-----|-------|---|
| (1) | 20-30 | µg hochmolekulare DNA |
| (2) | 5 | µl 10 x Enzympuffer |
| (3) | 60-90 | U Enzym (3-facher Überschuß) |
| (4) | ad | 50 µl H ₂ O _{bidest.} |

Die Reaktionsbestandteile wurden im Eppendorfgefäß gemischt und bei 37 °C 10-14 Stunden inkubiert. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurde der Ansatz nochmals gemischt und kurz abzentrifugiert.

Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Spaltungen anhand entnommener Aliquots auf einem 0,8 %igen Agarose-Minigel auf Vollständigkeit der Hydrolyse kontrolliert.

Anschließend wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen 10 x Auftragspuffer versetzt und das DNA-Fragmentgemisch auf einem horizontalen 0,8-1,0 %igen Agarose-Gel in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sharp *et al.*, 1973) mit einem entsprechenden Größenmarker (*Hind*III und *Eco*RI gespaltene λ-DNA) bei maximal 80 mA elektrophoretisch aufgetrennt.

Nachdem die BPB-Farbstofffront ca. 13 cm gelaufen war, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel im UV-Lichtdurchleuchter (254 nm) mit einer Polaroidkamera fotografiert.

50 x Elektrophoresepuffer (TAE):

- | | | |
|------|---|-------------|
| 2 | M | Tris |
| 5,71 | % | Eisessig |
| 0,5 | M | EDTA pH 8,0 |

- | | | | |
|----------------------|------|---|-------------------------------------|
| 10 x Auftragspuffer: | 0,25 | % | BPB |
| | 0,25 | % | Xylencyanol |
| | 25 | % | Ficoll 400 |
| | in | | H ₂ O _{bidest.} |

Ethidiumbromid-Lösung: 20 mg/ml in H₂O_{bidest}

	mM						
10xPuffer	Tris-HCl	NaCl	MgCl ₂	DTT	KCl	B	G
niedrig	100	—	100	10	—	—	—
mittel	100	500	100	10	—	—	—
hoch	500	1000	100	10	—	—	—
<i>Eco</i> RI	1000	500	100	—	—	—	—
<i>Sma</i> I	100	—	100	10	200	—	—
<i>Bgl</i> II	—	—	100	—	—	70	200
B : β - Mercaptoethanol G : Glycin - NaOH							

Tab. 2 : 10 x Enzympuffer

5.4.3

Übertragung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente auf Nitrozellulosefilter oder Nylonmembranen (Southern Blot)

Zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen in restriktionsendonukleolytischer, genomischer DNA nach Auftrennung in Agarose-Gelen wurde diese nach einem modifizierten Verfahren nach Southern (1975) auf Nitrozellulosefilter oder Nylonmembranen übertragen.

Das Gel wurde zunächst in 0,25 M HCl 10-20 Minuten geschwenkt. Anschließend erfolgte eine zweimal 15 minütige Denaturierung und Neutralisierung. Danach wurde das Gel auf 2 Lagen mit 20 x SSC getränktem 3MM Whatman Papier gelegt. Diese wiederum befanden sich auf einem ebenfalls mit 20 x SSC getränktem 3MM Whatman Papier überdeckten Plastikrost. Die durch das Gitter des Plastikrosts herabhängenden Papierenden tauchten in eine mit 20 x SSC gefüllte Plastikschaale ein. Beim Auflegen des Gels auf das 3MM

Whatman Papier wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen eingeschlossen waren.

Auf das Gel wurde ein in gleicher Größe zugeschnittener Nitrozellulosefilter, der zuvor 10 Minuten in $H_2O_{bidest.}$ und 20 Minuten in 20 x SSC gebadet wurde, luftblasenfrei gelegt. Darauf kamen 2 Lagen 3MM Whatman Papier (20 x SSC getränkt) und ein 8-10 cm hoher Stapel aus Kleenex- und Papierhandtüchern der gleichmäßig beschwert wurde.

Nach einer 16-20 stündigen Transferzeit (Maniatis *et al.*, 1982) wurde der Filter nach entsprechender Kennzeichnung kurz in 6 x SSC getaucht und dann mindestens 2 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank gebacken.

Er konnte dann sofort oder auch noch nach längerer Lagerung zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Mit Nylonmembranen (Hybond-N™) wurde in gleicher Weise verfahren. Hier erfolgte die Fixierung der DNA auf der Membran nicht durch Backen, sondern durch eine 2-5 minütige Irridation im UV-Lichtdurchleuchter.

Denaturierungspuffer: 0,5 M NaOH
 1,5 M NaCl

Neutralisierungspuffer: 0,5 M Tris
 2 M NaCl
 pH 5,5

20 x SSC: 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat

5.4.3.1 Kopiezahlbestimmung durch Dot Blot-Analyse

Zur Bestimmung der Anzahl der in das Wirtsgenom integrierten Genkonstrukte wurde eine Dot Blot-Analyse durchgeführt.

Hierzu wurden jeweils 1, 2, 4, 8 und 10 µg der zu untersuchenden DNA und 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} und 10^{-3} µg DNA des entsprechenden Genkonstrukts in 10 µg Lachssperma-DNA in 30 µl TE(10/1) gelöst und 5 Minuten bei 100 °C hitzedenaturiert. Die Proben wurden dann sofort im Eiswasserbad auf 0 °C abgekühlt, mit 30 µl Denaturierungspuffer gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Währenddessen wurde ein 8 x 12 cm² großer Nitrozellulosefilter 10 Minuten in $H_2O_{bidest.}$, anschließend 20 Minuten in 20 x SSC gebadet und in eine Bio Rad Bio-Dot™ Apparatur eingespannt.

Nach erfolgter Denaturierung der DNA-Proben wurden diese mit 30 µl Neutrolisierungspuffer versetzt und unter Vakuum auf den Nitrozellulosefilter aufgetragen. Nachdem das gesamte Volumen die Membran passiert hatte, wurde mit je 100 µl 6 x SSC und 20 x SSC gewaschen.

Nach dem Backen bei 80 °C erfolgte die Vorhybridisierung und anschließend die Hybridisierung, wie in Kap. 5.4.5 beschrieben.

Für die Berechnung der Kopiezahlen eines mikroinjizierten Gens in chromosomaler DNA wurde eine haploide Genomgröße von 3×10^6 kb zugrunde gelegt (Winnacker, 1984).

Die Ergebnisse der Dot Blot-Analyse unterliegen einem gewissen Fehler, der sich aus der Ungenauigkeit des experimentellen Systems ergibt (z. B. Pipettierfehler). Die Kopiezahlen stellen deshalb keine exakten Werte dar.

5.4.4 Markierung von DNA-Fragmenten mit [α - 32 P]dCTP

5.4.4.1 Nick-Translation

In vitro-Markierung zirkulärer Plasmide oder linearer DNA-Fragmente erfolgte durch Nick-Translation (Rigby *et al.*, 1977; Kelly *et al.*, 1970). In einem Standardreaktionsansatz (20 µl) zum Nachweis einzelner Genkopien in genomischer DNA waren enthalten (Maniatis *et al.*, 1982) :

(1)	1 µg	lineare oder zirkuläre DNA
(2)	30-100 µCi	[α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol)
(3)	$1/10$ Vol.	10 x Nicktranslationspuffer
(4)	x µl	H ₂ O _{bidest.}
(5)	1 µl	DNase I (1:10 ⁴ verdünnt)
(6)	7,5 U	DNA-Polymerase I (5U/µl)

Die Reaktionsbestandteile wurden bei Raumtemperatur im Eppendorfgesäß gemischt und anschließend DNase I hinzugegeben. Nach 1,5 Minuten wurde die Reaktion bei 16 °C mit DNA-Polymerase I weitere 1-3 Stunden inkubiert. Unter diesen Bedingungen ist die Reaktion nur von der Anzahl der gebildeten Brüche im Einzelstrang ("Nicks") begrenzt (Rigby *et al.*, 1977).

Durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 wurde die Reaktion nach ungefähr 2 Stunden beendet und der gesamte Ansatz zur Abtrennung nicht-eingebauter Nukleosidtriphosphate über eine Sephadex-G50 fine-Säule (1,5 ml Volumen), die zuvor mit TE(10/1) equilibriert wurde, gereinigt und in Fraktionen zu ca. 130 µl (4-5 Tropfen) aufgefangen. Fraktionen mit

markierter DNA höchster spezifischer Aktivität wurden gesammelt und ein Aliquot (1 μ l) im Szintillationszähler gemessen. Durchschnittliche Ausbeuten lagen bei 2×10^7 bis 6×10^8 cpm/ μ g DNA.

10 x Nicktranslationspuffer (Maniatis *et al.*, 1982):

0,5	M	Tris-HCl pH 7,2
0,1	M	MgSO ₄
1	mM	DTT
500	μ g/ml	BSA
10	mM	dATP
10	mM	dGTP
10	mM	dTTP

DNase I:	1	mg	DNase I
	0,1	M	NaCl
	50	%	Glycerin

5.4.4.2 Hexanukleotid "geprimte" DNA-Markierung

Ein neueres Verfahren zur Markierung spezifischer DNA-Fragmente mit höheren Ausbeuten und einem beträchtlich besseren Verhältnis zwischen Hintergrund und Signal wurde von Feinberg and Vogelstein (1983, 1984) beschrieben.

Hierbei werden nur 25 ng DNA zur Markierung eingesetzt und nach Hitzedenaturierung mit Oligonukleotiden hybridisiert (Oligo-Multipriming). Die höchsten Markierungsausbeuten erhält man durch "Priming" mit Zufallshexanukleotiden (Feinberg and Vogelstein, 1983).

Ein Standardreaktionsansatz (50 μ l) enthält dabei:

(1)	25 ng	DNA in 28 μ l H ₂ O _{bide} st.
(2)	11 μ l	OLB-Puffer
(3)	4 μ l	BSA (5mg/ml)
(4)	50 μ Ci	[α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol)
(5)	2 U	Klenow-Fragment (1 U/ μ l)

Die DNA wurde zunächst 2 Minuten bei 100 °C denaturiert und dann sofort auf Eis gekühlt. Sämtliche weiteren Bestandteile wurden der Reihe nach hinzu -

pipettiert, gemischt und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur mindestens 3 Stunden inkubiert.

Die weitere Aufbereitung erfolgte, wie unter 5.4.4.1 beschrieben.

Die Ausbeuten lagen bei diesem Verfahren reproduzierbar um 2×10^9 cpm/ μ g.

Lösung O: 1,25 M Tris-HCl
 0,125 M MgCl₂
 pH 8,0

Lösung A: 1 ml Lösung O
 18 μ l β -Mercaptoethanol
 je 5 μ l dNTP-Lösung

Lösung B: 2 M Hepes pH 6,6
 (mit 4 M NaOH einstellen)

Lösung C: Hexanukleotid-Lösung in TE(10/1) mit 90 OD/ml

Die Hexanukleotid-Lösung wurde durch DNase I-Spaltung von genomischer Kalbsthymus-DNA gewonnen.

300 μ g Kalbsthymus-DNA wurden mit DNase I 10 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend über ein 20 % Polyacrylamid-8M Harnstoff-Sequenzgel (30 x 15 x 0,05 cm³) aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 Volumen Formamid-Auftragspuffer versetzt, bei 100 °C 2 Minuten denaturiert und dann in die vorher gereinigten Geltaschen pipettiert. Das Gel war zuvor 30 Minuten bei 55 °C, 20 V/cm in 1 x TBE-Puffer vorelektrophoresiert worden.

Nachdem die BPB-Farbstofffront bis zur Mitte des Gels gelaufen war, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde in eine Haushaltsfolie eingewickelt und durch UV-Fluoreszenzlöschung mittels einer Kieselgel-Dünnschicht-Chromatographieplatte, die mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet ist (Merck, Kieselgel 60, F 254), das Oligonukleotidgemisch im UV-Auflicht sichtbar gemacht (Abb. 1).

Der Bereich der Hexanukleotide wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, die Gelstücke zerkleinert und in eine 1 ml Pipettenspitze, die an der Spitze zugeschmolzen und mit silanisierter Glaswolle verstopft war, überführt. Nach Zugabe von 600 μ l H₂O_{bidest.} wurde die Pipettenspitze mit Parafilm fest verschlossen und über Nacht unter leichtem Schütteln bei 37 °C

inkubiert (Maxam and Gilbert, 1980). Danach wurde die zugeschmolzene Spitze abgeschnitten und die Lösung in ein Eppendorfgefäß abzentrifugiert.

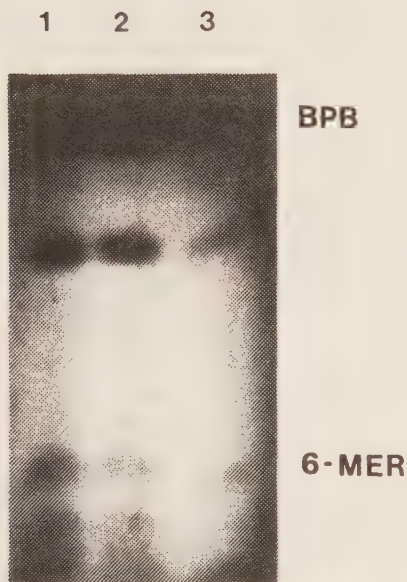


Abb. 1 : 20 % Polyacrylamid-Sequenzgel zur Isolierung von Zufallshexa - nukleotiden

300 µg Kalbsthymus-DNA wurden mit DNase I 10 Stunden bei 37 °C inkubiert und das DNA-Fragmentgemisch auf einem 20 % Polyacrylamid-Sequenzgel aufgetrennt. Durch UV-Fluoreszenzlösung wurde das Oligonukleotidgemisch sichtbar gemacht und der Bereich der Hexanukleotide isoliert.

1 u. 2: Oligonukleotidgemisch nach der DNase I-Spaltung

3: Hexanukleotidgemisch nach der Reinigung

Die DNA-Lösung wurde dann durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3,0 M Natriumacetat pH 5,2 , $\frac{1}{10}$ Volumen 0,1 M $MgCl_2$ und 2,5 Volumen absolutem Ethanol bei -80 °C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (20 000 Upm, 2-4 °C, 60 Minuten) im SS34-Rotor wurde das Pellet in 100 µl

0,3 M Natriumacetat pH 5,2 und 10 mM MgCl_2 resuspendiert und erneut eine ethanolische Fällung durchgeführt.

Das Pellet wurde kurz im Vakuum getrocknet und vor der Konzentrationsbestimmung bei 260 nm im Spektralphotometer in 200 μl TE(10/1) gelöst.

Formamid-Auftragspuffer: 98 % Formamid (entionisiert)
 10 mM EDTA pH 8,0
 0,2 % BPB
 0,2 % Xylencyanol

OLB-Puffer: Zur Herstellung des OLB-Puffers wurden die
 Lösungen A:B:C im Verhältnis 100:250:150 ge-
 mischt.

dNTP-Lösungen: 3 mM Tris-HCl pH 7,0
 0,2 mM EDTA pH 8,0
 je 0,1 M dATP
 dGTP
 dTTP

BSA-Lösung: 5 mg BSA (Fraktion V) in 1ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

5.4.5 Hybridisierung filtergebundener DNA und Autoradiographie

Die gebackenen Nitrozellulosefilter wurden 2 Minuten in 6 x SSC befeuchtet und bis zu drei Filter in einer Plastiktüte eingeschweißt.

Durch eine Öffnung am Rand wurden ungefähr 100-200 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Nitrozel-
lulosefilter Vorhybridisierungspuffer eingefüllt.

Ultraschallte Lachssperma- oder Kalbsthymus-DNA wurden 10 Minuten bei 100 °C hitzedenaturiert, danach sofort auf Eis abgeschreckt und zum Vorhybridisierungspuffer hinzupipettiert. Anschließend wurden sämtliche Luftblasen sorgfältig entfernt und die Filter bei 42 °C im Wasserbadschüttler mindestens 6 Stunden vorhybridisiert. Nach ungefähr einer Stunde Vorhybridisierung wurden nochmals Luftblasen, die sich gebildet hatten, durch Ausrollen mit einer Pipette entfernt.

Nach der Inkubation wurde der Vorhybridisierungspuffer abgegossen und durch den Hybridisierungspuffer ersetzt. Diesem wurde die hitzedenaturierte, radioaktivmarkierte DNA beigemischt. Das Volumen des Hybridisierungspuffers betrug 30-50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Nitrozellulosefilter.

Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C im Wasserbadschüttler für 12-16 Stunden (Maniatis *et al.*, 1982; McConaughy *et al.*, 1969). Danach wurde der radioaktive Puffer entfernt und für weitere Hybridisierungen bei -20 °C aufbewahrt.

Die Nitrozellulosefilter wurden rasch aus der Plastikfolie genommen und zunächst zweimal jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen. Durch weiteres zweimaliges Waschen für jeweils 20 Minuten bei 55 °C in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS wurde eine ausreichende Stringenz erreicht. Danach wurden die Filter kurz luftgetrocknet, in Haushaltsfolie eingewickelt und bei -80 °C mit einer Verstärkerfolie auf einem Röntgenfilm zwischen 1 und 2 Tagen exponiert.

Vorhybridisierungspuffer:

50 x Denhardt's	5 ml
20 x SSC	12,5 ml
Formamid	25 ml
10 % SDS	0,5 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml
+ 400 µg/ml Lachssperma- oder Kalbsthymus-DNA	

Hybridisierungspuffer:

50 x Denhardt's	2,5 ml
20 x SSC	12,5 ml
Formamid	25 ml
10 % SDS	0,5 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml
+ markierte DNA	

50 x Denhardt's:	1% PVP
	1 % Ficoll 400
	1 % BSA
	in H ₂ O _{bidest.}

6.1

Klonierung des Plasmids pMTGRF-1

Die Verwendung von Genkonstrukten, bestehend aus dem Maus Metallothionein-I Promotor (mMT-I) und dem Wachstumshormongen des Menschen (hGH) oder der Ratte (rGH), zur Erstellung transgener Mäuse, Kaninchen, Schafe und Schweine wurde von wenigen Autoren beschrieben (Palmiter *et al.*, 1982 a; Palmiter *et al.*, 1983; Hammer *et al.*, 1985 a; Brem *et al.*, 1985).

Ein Teil der Mäuse, die MThGH- oder MTrGH-Sequenzen nach Mikroinjektion in ihr Genom integriert hatten, zeigten deutlich vermehrtes Größenwachstum und wurden z. T. mehr als 100 % schwerer als Kontrolltiere (Palmiter *et al.*, 1982 a; Palmiter *et al.*, 1983; Brem *et al.*, 1985).

Bei Schweinen konnte jedoch trotz nachweisbarer Expression der mikroinjizierten Fremd-DNA kein vermehrtes Wachstums festgestellt werden (Hammer *et al.*, 1985 a). Dies mag nicht verwundern, da selbst tägliche Injektionen von hGH bei Schweinen keinen meßbaren Einfluß auf Gewichts- oder Größenzunahme haben. Nur bei Gabe von homologem pGH können Wachstumssteigerungen bis zu 10 % während der Hauptwachstumsphasen erzielt werden (Hammer *et al.*, 1985 a).

Der Einfluß des Wachstumshormon-Releasing Factors (GRF) auf die Ausschüttung und Bildung von GH konnte von Hammer *et al.* (1985 b) in Experimenten mit transgenen Mäusen gezeigt werden. Er mikroinjizierte ein Konstrukt, bestehend aus dem mMT-I Promotor und einem menschlichen GRF-"Minigen" (Abb. 2).

Transgene Mäuse zeigten erhöhte mGH-Werte im Plasma und vermehrtes Größenwachstum.

Mit der Klonierung eines mikroinjizierbaren Genkonstrukts, bestehend aus dem Maus Metallothionein-I Promotor und dem Wachstumshormon-Releasing Factor-Gen des Menschen, sollten deshalb die oben genannten Probleme beim Schwein umgangen werden.

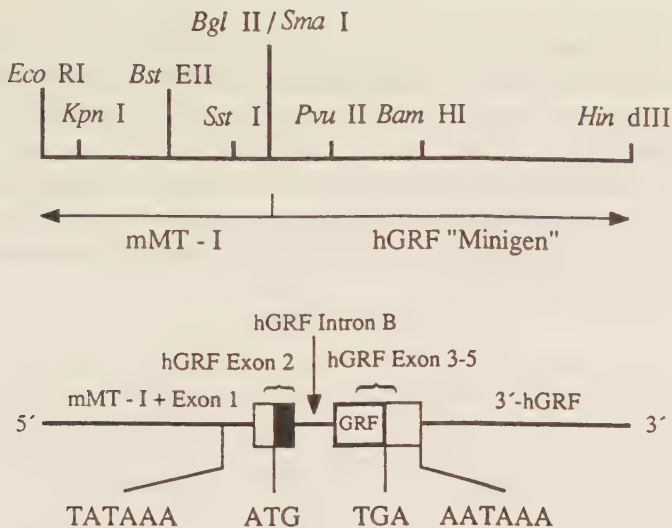


Abb. 2: Struktur des mMT-I/GRF-Fusionsgens (Hammer *et al.*, 1985 b)
 Das von Hammer *et al.* (1985 b) mikroinjizierte Konstrukt (2,5 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment) besteht aus dem mMT-I Promotor mit 5'-flankierenden Sequenzen und dem Exon 1 des hGRF-Gens, fusioniert mit dem Exon 2 des hGRF-Gens in einer *BglII/SmaI*-Schnittstelle. Weitere Bereiche des Konstrukts und deren Herkunft sowie die wesentlichen Expressionssignale sind angegeben.

6.1.1 Der Metallothionein-I Promotor der Maus (mMT-I) als regulatorisches Element

Metallothioneine (MT) sind kleine cysteinreiche Proteine (6 000-7 000 Da), die Schwermetalle wie Zink, Cadmium, Kupfer oder Quecksilber binden. Es wird angenommen, daß sie im Zinkstoffwechsel und der Schwermetallentgiftung eine Rolle spielen (Durnam *et al.*, 1980; Glanville *et al.*, 1981; Hager and Palmer, 1981). Die meisten Säugetiere besitzen zwei Formen des Metallothioneins, die bei der Maus als mMT-I und mMT-II bezeichnet werden. Beim Mensch sind mindestens 4 bis 5 verschiedene hMT-I Gene und ein hMT-II Gen bekannt (Kägi *et al.*, 1984). Auch bei der Ratte handelt es sich beim rMT-I Gen um eine Gruppe von Genen, von denen 3 Pseudogene rMT-I α , rMT-I β und rMT-I γ bereits sequenziert sind (Andersen *et al.*, 1986).

Ihre Expression wird sowohl durch Schwermetalle, Stress, bakterielle Endotoxine und Jodacetat als auch Glucocorticoide vor allem in der Leber und den

Nieren stimuliert. Bei Gabe von Dexamethason kann eine Expression auch im Herz, in der Milz und der Skelettmuskulatur induziert werden (Hager and Palmiter, 1981; Searle *et al.*, 1984; Varshney *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1986).

Die Induzier- und Steuerbarkeit der Expression eines Gens, das unter der Kontrolle des zu den Metallothionein-Genen gehörigen Promotors steht, läßt diesen als regulatorisches Element in mikroinjizierbaren Genkonstrukten als besonders geeignet erscheinen.

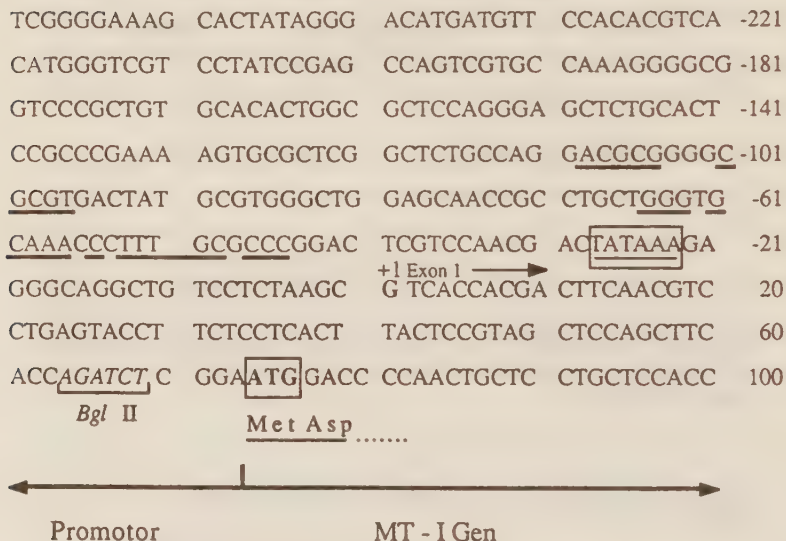


Abb. 3: Sequenz des regulatorischen Bereichs des mMT-I Promotors (Glanville *et al.*, 1981)

Der regulatorische Bereich des mMT-I Promotors zeigt bei -22 bis -28 (umrandet und unterstrichen) die TATA-Box und stromaufwärts (unterstrichen) ausgedehnte palindrome Sequenzbereiche. Der Startpunkt der RNA-Polymerase II ist mit +1(G) gekennzeichnet. An Position +74 befindet sich das Startcodon des MT-Gens (umrandet).

In vielen Konstrukten bei der Transfektion oder Mikroinjektion von Zellen oder Erstellung von transgenen Tieren wurde der mMT-I Promotor bisher verwandt (Palmiter *et al.*, 1982 a, b; Palmiter *et al.*, 1983; Palmiter *et al.*, 1985; Hammer *et al.*, 1985 a; Hammer *et al.*, 1985 b; Swanson *et al.*, 1985;

Brem *et al.*, 1985; Low *et al.*, 1985; Low *et al.*, 1986). Wie viele eukaryontische Promotoren, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden (Corden *et al.*, 1980), enthält der mMT-I Promotor eine Goldberg-Hogness Box (5'-TATAAAG-3') bei Position -22 bis -28 (Abb. 3), während die Konsensussequenz 5'-GCT_T/C_AATCT-3' nicht vorhanden ist (Glanville *et al.*, 1981).

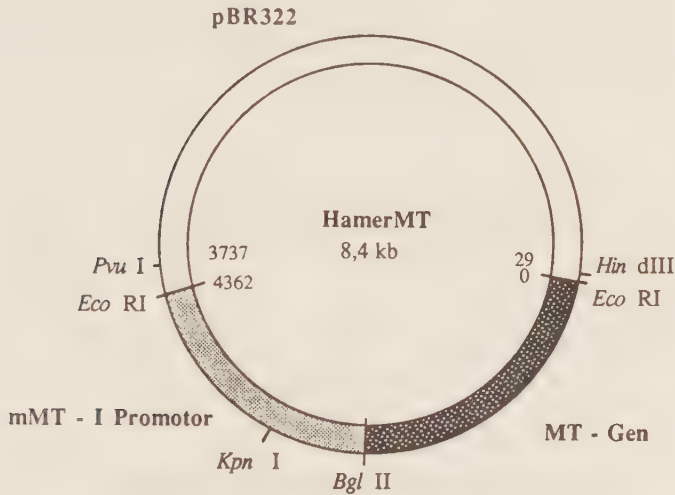


Abb. 4 : Struktur des Plasmids HamerMT (Lipp, 1985)

Das Plasmid HamerMT enthält das MT-Gen der Maus mit seinem Promotor, welches in die *Eco*RI-Schnittstelle von pBR322 kloniert ist. Durch *Pvu*I/*Bgl*II-Spaltung läßt sich der mMT-I Promotor mit 625 bp von pBR322 isolieren. Wichtige Schnittstellen sind angegeben. Die Zahlen im Inneren des Plasmids beziehen sich auf pBR322 Koordinaten.

Zwischen den Positionen -65 bis -45 und -109 bis -97 befinden sich zwei ausgedehnte palindrome Sequenzbereiche (Abb. 3). Der mMT-I Promotor unterscheidet sich damit z. B. von der Promotorregion des rMT-I Gens (Andersen *et al.*, 1986). Glanville *et al.* (1981) konnten durch S1-Nuklease-Analyse den Startpunkt der mRNA im Promotor ermitteln (Position +1, G). Die eigentliche Konsensussequenz vergleichbarer mRNA-Startpunkte 5'-PyCAPy-3' (Py = Pyrimidin) liegt 3 bp weiter stromabwärts. Bei dieser Sequenz beginnt die mRNA bei dem Nukleotid "A". 10 bp in 5'-Richtung vom

Startcodon des MT-Gens entfernt, befindet sich eine *Bgl*III-Schnittstelle, die sich zur Fusion mit anderen Strukturgenen eignet.

Der mMT-I Promotor wurde aus dem Plasmid HamerMT (Abb. 4) isoliert. Dieses Plasmid enthält das gesamte MT-Gen mit seinen regulatorischen Sequenzen, welches in die *Eco*RI-Schnittstelle von pBR322 kloniert ist. Um die *Eco*RI-Schnittstelle am 5'-Ende des Promotors zu erhalten, wurde die einzige an Position 3737 im pBR322 Genom befindliche *Pvu*I-Erkennungsstelle, 625 bp in 5'-Richtung der Promotor-Insertion, zur Isolierung verwandt und so der mMT-I Promotor als 2,4 kb-Fragment aus HamerMT isoliert. Durch Behandlung mit T4 DNA-Polymerase wurden die überstehenden 3'-Enden entfernt bzw. 5'-Enden aufgefüllt (Abb. 5).

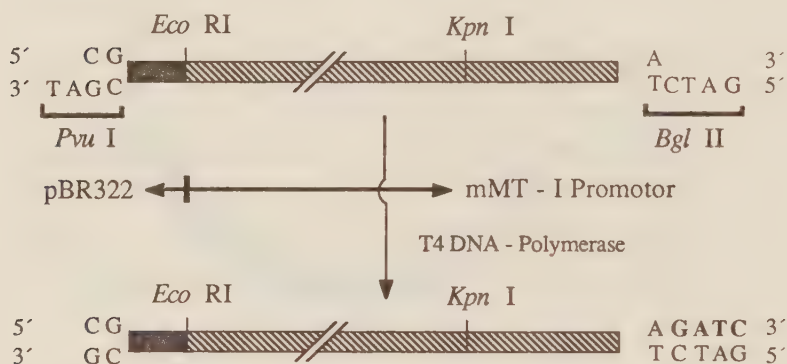


Abb. 5: Struktur des *Pvu*I/*Bgl*III-Promotorfragments aus Hamer MT (Erläuterung s.Text)

6.1.2 Der menschliche Wachstumshormon-Releasing Factor als Strukturgen

Die neurohormonelle Regulation der Bildung und Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) wird durch ein im Hypothalamus (*Nucleus supraopticus*) gebildetes Peptidhormon über ein venöses Kapillargeflecht im Hypophysenvorderlappen gesteuert (Guillemin *et al.*, 1982; Rivier *et al.*, 1982; Mayo *et al.*, 1983; Mayo *et al.*, 1985). Der sogenannte Wachstumshormon-Releasing Factor (Somatocrinin, GRH, GRF, GHRH, GHRF) wird zunächst als ein 107 oder 108 Aminosäuren (AS) langes Vorläuferprotein (prepro-GRF-107,

prepro-GRF-108) synthetisiert (Gubler *et al.*, 1983) und anschließend proteolytisch auf 44 AS verkürzt. 40 und 37 AS lange Formen, die ebenfalls biologisch aktiv sind, wurden von Mayo *et al.* (1985) beschrieben. Zur Konstruktion des Plasmids pMTGRF-1 wurden die kodierenden Bereiche des hGRF-Gens einer cDNA aus dem Expressionsvektor LZPGRF 1/3 (Leu 27) isoliert (Abb. 6).

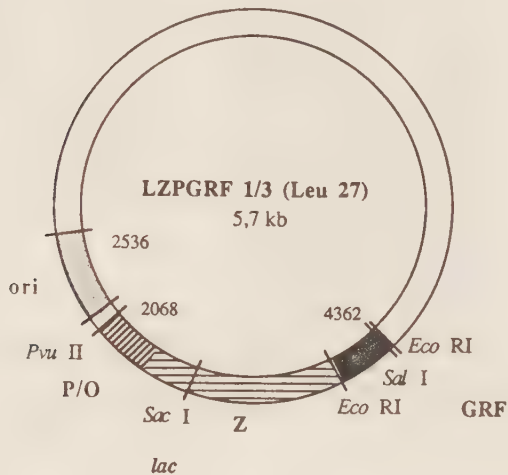


Abb. 6 : Struktur des Plasmids LZPGRF 1/3 (Leu 27) (Wetekam, 1985)
Der zur Gewinnung des menschlichen Wachstumshormon-Releasing Factors verwendete Expressionsvektor LZPGRF 1/3 (Leu 27) besteht aus dem Vektor pBR322 und einem verkürzten Promotor des Wildtyp *lacZ*-Gens, der mit der cDNA des hGRF-Gens ligiert wurde. Durch *SacI/SalI*-Hydrolyse läßt sich ein 1,2 kb-Fragment mit der gesamten hGRF-Sequenz und 1,05 kb des *lacZ*-Gens isolieren. Wichtige Schnittstellen sind angegeben.

Durch Spaltung mit *SacI* und *SalI* konnte ein 1,2 kb-Fragment, das Anteile des *lacZ*-Gens (1,05 kb) und die Sequenz des hGRF-Gens (Abb. 7) beinhaltete, präpariert und in pUC18 subkloniert werden. Dadurch wurde das Plasmid *placZGRF* gebildet (Abb. 13).

Fragment, bestehend aus pUC18 und dem 5'-Ende des mMT-I Promotors, entspricht. Die zweite zu erwartende Bande bei 0,8 kb, die dem 3'-Ende des mMT-I Promotors mit dem hGRF-Gen entspricht, ist sichtbar.

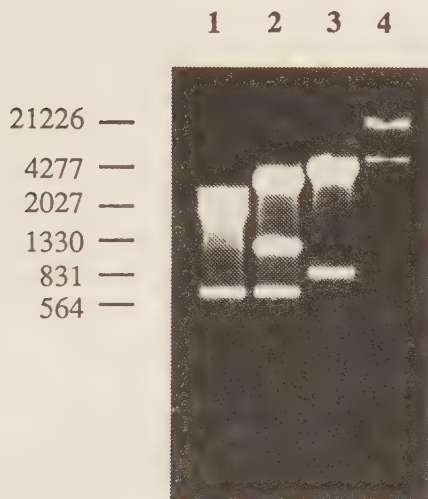


Abb. 8 : Restriktionsanalyse des Plasmids pMTGRF

Durch Doppelverdauung des Plasmids pMTGRF mit *EcoRI/SalI* (1), *EcoRI/KpnI* (2) und *SalI/KpnI* (3) wurde die richtige Orientierung des mMT-I Promotors zum Strukturgen hGRF kontrolliert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 0,8 %igen Agarosegel in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Als Größensmarker diente *HindIII* gesplattene λ -DNA (4).

Am 5'-Ende des Konstrukts konnte durch die Ligation der T4 DNA-Polymerase behandelten *PvuI*- und Klenow-Polymerase aufgefüllten *EcoRI*-Schnittstelle eine *EcoRI*-Erkennungssequenz wiederhergestellt werden. Das 3'-überstehende TA-Dinukleotid des *PvuI/BglII*-Promotorfragments wurde durch die 3' → 5' Exonuklease-Aktivität der T4 DNA-Polymerase entfernt und gleichzeitig die *BglII*-Schnittstelle am 3'-Ende des Fragments aufgefüllt (vgl. dazu Abb. 5). Die *EcoRI*-Schnittstelle des pGRF wurde mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und ein stumpfes Ende erzeugt (5'-GAATT-3'). Durch *EcoRI*-Hydrolyse wurde nach der Ligation mit T4 DNA-Ligase das 625 bp-Fragment aus pBR322 entfernt (Abb. 9).

Im Bereich der *Bgl*II/*Eco*RI-Fusion wurde die normale Entfernung des Start-codons zu regulatorischen Sequenzen des Promotors, wie es im MT-Gen der Fall ist, wieder hergestellt (Abb. 10).

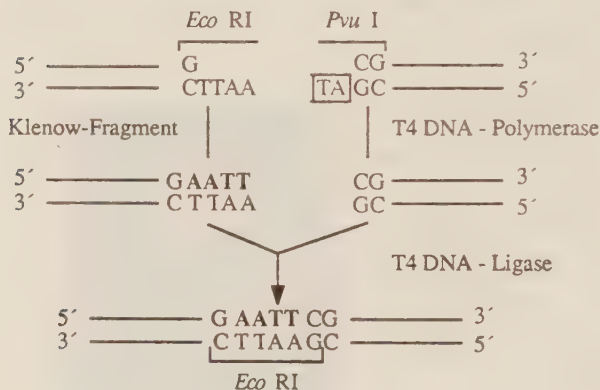


Abb. 9: Rekonstruktion einer *Eco*RI-Schnittstelle

Durch Behandlung der 5'-versetzten Enden des *Eco*RI-Fragments mit dem Klenow-Fragment wurde ein stumpfes Ende erzeugt (5'-GAATT-3'). Das 3'-überstehende Ende des *Pvu*II/*Bgl*II-Promotorfragments wurde durch die Abspaltung des TA-Dinukleotids mit T4 DNA-Polymerase in ein glattes überführt. Danach wurden die Fragmente mit T4 DNA-Ligase verknüpft und dadurch eine *Eco*RI-Schnittstelle rekonstruiert.

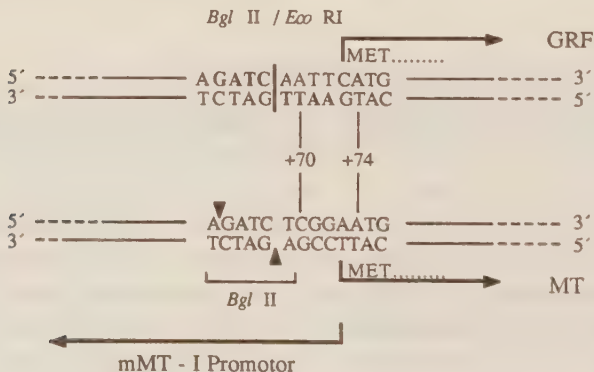


Abb. 10: Sequenzvergleich der Übergangsbereiche des mMT-I Promotors zum GRF- bzw. MT-Gen

Durch Ligation der aufgefüllten *Bgl*II- und *Eco*RI-Schnittstellen (Fettdruck) konnte die natürliche Anzahl der Nukleotide des MT-Gen im MTGRF-Konstrukt wiederhergestellt werden.

Eukaryontische Gene folgen einem komplizierten und bis heute nicht vollständig geklärten Aufbau.

Trotzdem wurden durch Sequenzvergleiche und *in vitro*-Transkriptions-experimente verschiedener eukaryontischer Gene bestimmte Bereiche eines Gens als bedeutend für dessen Expression erkannt (Breathnach and Chambon, 1981).

Hierzu gehören Signale stromabwärts des Stoppcodons, die zur korrekten Bildung eines primären Transkripts und einer translatierbaren mRNA führen.

Für die Konstruktion der 3'-Region des MTGRF wurde ein Teil des kleinen t-Antigens aus dem Affenvirus 40 (SV40), welcher in dem Plasmid pSV2-cat^s (Gorman *et al.*, 1982) enthalten ist, gewählt (Abb. 11). Er besitzt die Donor- und Akzeptorstellen des Introns des kleinen t-Antigens sowie das Signal zur Polyadenylierung.

Durch *EcoRI/BamHI*-Spaltung kann ein 1,38 kb langes Fragment aus pSV2-cat^s isoliert werden, das aus einem Bereich des kleinen t-Antigens und stromaufwärts 531 bp 5'-CAT-Gen-Sequenzen besteht. Am 3'-Ende des SV40-Anteils befinden sich die Signale zur Bildung eines mRNA 3'-Terminus. Es ist dies die hochkonservierte Hexanukleotidsequenz 5'-AATAAA-3', die für die Polyadenylierung von mRNAs, die von der RNA-Polymerase II gebildet werden, gebraucht wird, sowie eine in vielen eukaryontischen Genen und Viren vorkommende konservierte Region, ungefähr 30 bp stromabwärts der AATAAA-Box, 5'-PyGTGTPyPy-3' (Py = Pyrimidin) (McLauchlan *et al.*, 1985). In pSV2-cat^s ist diese Sequenz 24-33 bp stromabwärts des AATAAA-Signals und lautet 5'-TGTGGTTT-3'. Diese Nukleotidfolge, in 5'→3'-Richtung gelesen, kommt in 36, 57, 62, 66, 10, 43, 39 und 33 % aller von McLauchlan *et al.* (1985) verglichenen Gene vor. Er konnte anhand von CAT-Experimenten zeigen, daß das Fehlen dieser Sequenz zu unkorrekter oder fehlender Transkription und Translation führt.

Auf Grund dieser Untersuchungen und der Erfahrung, daß nicht-eukaryontische DNA-Bereiche in mikroinjizierten Genkonstrukten zu schlechterer Integration führen, wurde dieses Fragment gewählt. Der 5'-CAT-Anteil des Fragments wurde durch eine *HaeIII*-Spaltung auf 268 bp verkürzt und somit gleichzeitig ein glattes 5'-Ende zur Ligation geschaffen (Abb. 11).

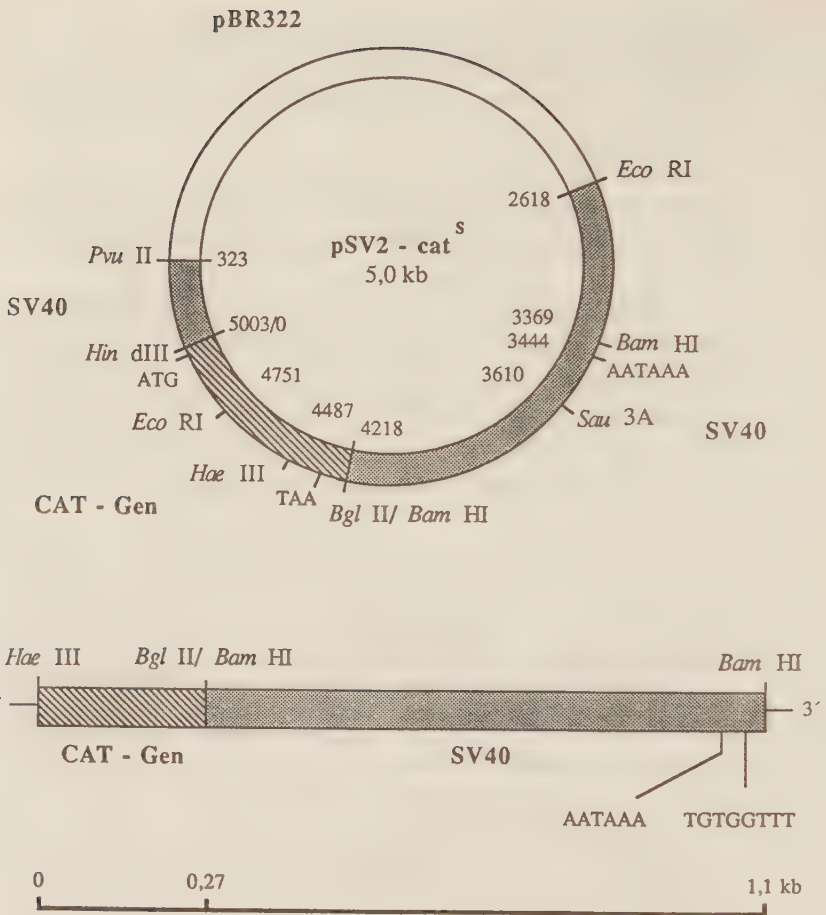


Abb. 11 : Struktur des Plasmids pSV2-cat^s (Gorman *et al.*, 1982) und des zur Konstruktion von pMTGRF-1 verwandten *Hae*III/*Bam*HI-Fragments

Aus dem Vektor pSV2-cat^s läßt sich durch Spaltung mit *Hae*III und *Bam*HI ein 1,1 kb-Fragment isolieren, das einen Teil des kleinen t-Antigens aus pSV2-cat^s sowie 5'-flankierende Sequenzen des CAT-Gens enthält.

Die Zahlen geben Positionen, gerechnet von der einzigen *Hind*III-Schnittstelle (5003/0), an. Wichtige Expressionssignale (Start-, Stoppcodon, Polyadenylierung) sind angegeben.

Der letzte Schritt zur Verknüpfung des MTGRF mit der 3'-Region konnte nun erfolgen.

Dazu wurde zunächst das Vorläuferplasmid pMTGRF (Abb. 13) mit *SalI* linearisiert, und die überstehenden Enden wurden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Dann wurde durch Nachspaltung mit *EcoRI* das Konstrukt MTGRF als *EcoRI*/"blunt"-Fragment isoliert und mit dem *HaeIII/BamHI*-Fragment (Abb. 11) in pUC18 kloniert.

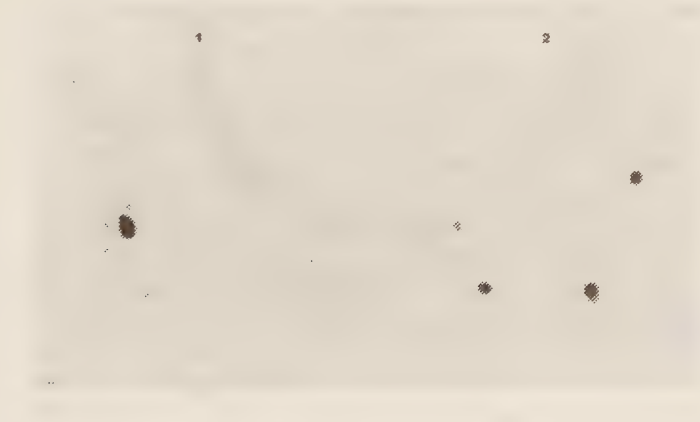


Abb. 12 a : Kolonie-Hybridisierung von *E. coli* JM83 Klonen nach Transformation mit pMTGRF-1

Durch Kolonie-Hybridisierung mit MTGRF (1) und einem 610 bp *Sau* 3A-Fragment aus dem *HaeIII/BamHI*-Fragment von pSV2-cat^S (2) als Proben konnte ein Klon identifiziert werden, der das vollständige Konstrukt pMTGRF-1 enthielt.

Aus etwa 100 rekombinanten Klonen konnte durch Kolonie-Hybridisierung sowohl mit markiertem MTGRF als auch einem markierten *Sau*3A-Subfragment des *HaeIII/BamHI*-Fragments ein Klon mit dem vollständigen Konstrukt identifiziert werden (Abb. 12 a, b).

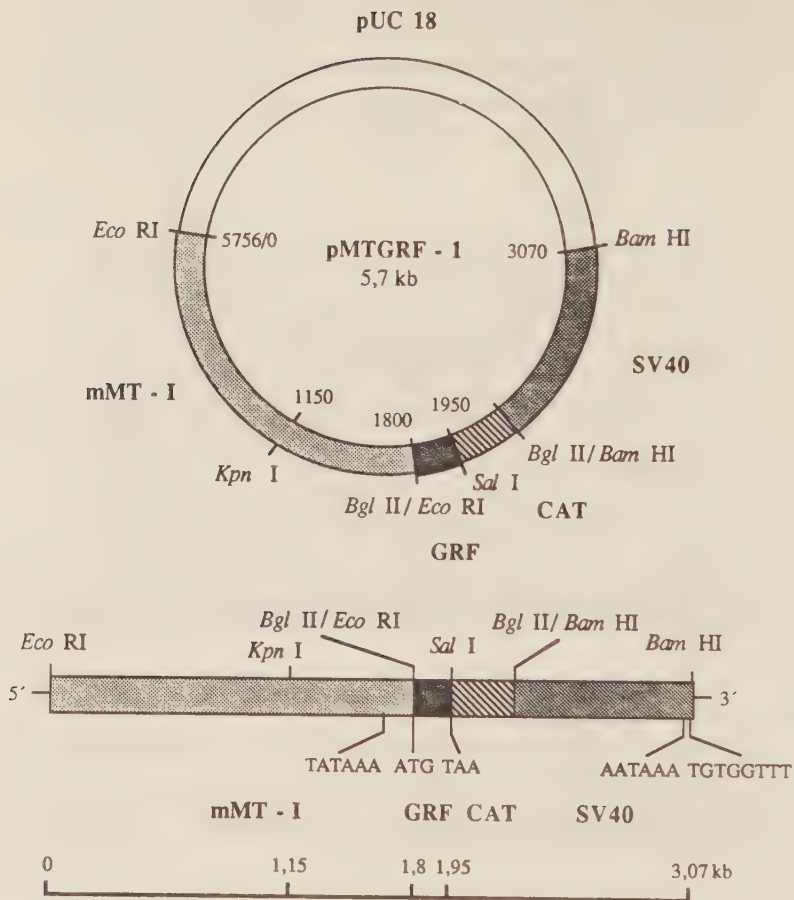


Abb. 12 b : Struktur des Plasmids pMTGRF-1 und des Genkonstrukts MTGRF-1 mit wesentlichen Expressionssignalen

Das Plasmid pMTGRF-1 (5,7 kb) beinhaltet ein Genkonstrukt (3,07 kb), bestehend aus dem mMT-I Promotor, der mit dem Wachstumshormon-Releasing Factor-Gen des Menschen durch eine *BglII/EcoRI*-Fusion ligiert wurde. 3'-Expressionssignale stammen aus einem Teil des kleinen t-Antigens des SV40 und sind ebenso wie Signalsequenzen des Promotors und das Start- und Stoppcodon des hGRF-Gens angegeben.

In Abbildung 13 wird das Klonierungsschema zusammengefaßt.

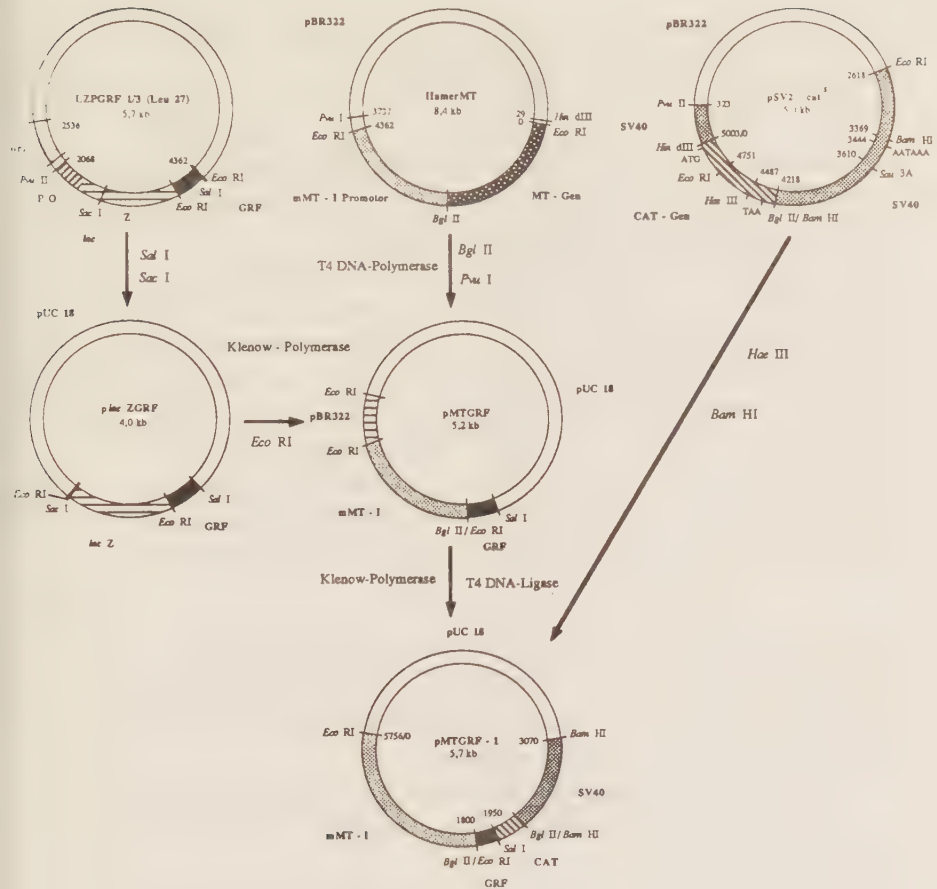


Abb. 13 : Strategie der Klonierung des Plasmids pMTGRF-1

Aus den drei Ausgangsplasmiden LZPGRF 1/3 (Leu 27), HamerMT und pSV2-cat^S wurden die Bestandteile des Plasmids pMTGRF-1 isoliert. Zunächst wurden zwei Vorläuferplasmide *plac*GRF, das die kodierende Region des hGRF-Gens beinhaltet, und pMTGRF mit dem Fusionsgen, bestehend aus dem mMT-I Promotor und der hGRF-Sequenz, gebildet. Durch Ligation des pMTGRF mit einem Teil der 3'-Region des kleinen t-Antigens aus pSV2-cat^S konnte das Plasmid pMTGRF-1 kloniert werden. Das für Mikroinjektionen zu verwendende Fusionsgen MTGRF-1 läßt sich als 3,07 kb *EcoRI/BamHI*-Fragment aus pMTGRF-1 isolieren.

Vor der Verwendung des MTGRF-1 Genkonstrukts zur Erstellung transgener Tiere wurde dieses *in vitro* auf Transkription getestet.

Zunächst wurde das Vorhandensein aller für die Expression wesentlichen Sequenzen kontrolliert. Dabei galt es zu zeigen, daß bei der Klonierung die Erkennungssequenzen der RNA-Polymerase II im Promotor, deren Entfernung vom Startcodon des Strukturgens, das Start- und Stoppcodon des Strukturgens sowie die nachfolgende 3'-Region nicht verändert wurden.

Mit Hilfe der Doppelstrangsequenzierung wurden sämtliche Vorläuferplasmide des pMTGRF-1 und das Plasmid pMTGRF-1 selbst jeweils von beiden Seiten des Polylinkers her sequenziert und die Vollständigkeit des Konstrukts nachgewiesen (Abb. 14). Die Abbildung gibt die Sequenz des nicht kodierenden Stranges, vom 3'-Ende des Wachstumshormon-Releasing Factor-Gens gelesen, wieder. Sie reicht über die *EcoRI/BglIII*-Fusionsstelle hinaus bis in den mMT-I Promotor hinein. Am 3'-Ende des Konstrukts ist das Stoppcodon des hGRF-Gens (3'-ATT-5') erhalten. Durch die *EcoRI/BglIII*-Fusion wurde das Startcodon nicht verändert. Die regulatorischen Sequenzen des Promotors (TATA-Box, Palindrome bei -42 bis -65) sind vorhanden.

Nach der Sequenzanalyse wurde die Transfektion in Kulturzellen zur Transkriptionskontrolle durchgeführt. Für dieses Experiment eignen sich besonders BHK(tk-ts13)-Zellen, da diese mit sehr hoher Ausbeute bis zu 70 % (Winnacker, 1984) transfiziert werden können.

In zwei Ansätzen wurde das Plasmid pMTGRF-1 mit (Endkonzentration : 3 µM) und ohne Zinksulfat-Stimulation in einem Ansatz pSV2-cat^s transfiziert. Ein Ansatz blieb untransfiziert.

Nach 30 Stunden wurden die Zellen zur RNA-Isolierung geerntet und die RNA im Northern Blot analysiert.

Um keine Hybridisierung des im pMTGRF-1 enthaltenen 268 bp langen Fragments des CAT-Gens mit der CATmRNA aus dem mit pSV2-cat^s transfizierten Ansatz zu bekommen, wurde das Vorläuferplasmid pMTGRF zur Hybridisierung verwandt.

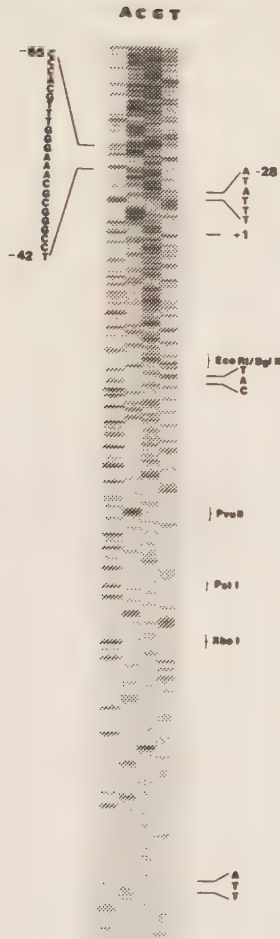


Abb. 14 : 5 %-PAA-Sequenzgel zur Bestimmung der Nukleotidabfolge des hGRF-Gens, der *Bgl*III/*Eco*RI-Fusionsstelle von MTGRF und wichtiger Expressionssignale im Promotor

Durch Doppelstrangsequenzierung wurde die Vollständigkeit des pMTGRF-1 und das Vorhandensein wesentlicher Expressionssignale kontrolliert. Wichtige Sequenzbereiche und Schnittstellen sind angegeben.

Während bei beiden Transfektionen mit pMTGRF-1 ein deutliches Signal, das im Zinksulfat stimulierten Ansatz verstärkt ist, zu sehen ist, ließen sich in den Kontrolltransfektionen keine homologen Bereiche nachweisen (Abb. 15). Die Größe der gebildeten mRNA entspricht den theoretischen Berechnungen von ungefähr 1,2 kb und läuft unterhalb der 18S RNA.

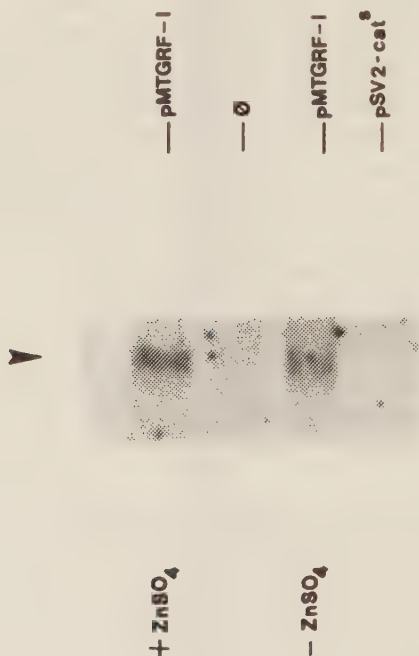


Abb. 15 : Northern Blot-Analyse zytoplasmatischer RNA aus der Transfektion von BHK-Zellen mit pMTGRF-1 und pSV2-cat^S. Jeweils 30 µg zytoplasmatische RNA aus den Transfektionen mit pMTGRF-1 (mit und ohne ZnSO₄-Stimulation), pSV2-cat^S und einer untransfizierten Kontrolle (Ø) wurden in einem 1,4 %igen Formaldehyd-Agaroseflächgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit pMTGRF hybridisiert. Der Nitrozellulosefilter wurde dann 3 Tage bei -80 °C mit einer Verstärkerfolie exponiert.

Der Nachweis des MTGRF-1 Konstrukts in mikroinjizierten transgenen Tieren läßt sich auf Grund des Fragments aus pSV2-cat^S ohne Schwierigkeiten führen. Verwendet man bei der Hybridisierung als Probe pSV2-cat^S, sind keine Kreuzhybridisierungen mit endogenen Sequenzen zu erwarten.

Zur Erstellung transgener Tiere wurden zwei Konstrukte verwendet, deren Aufbau und Struktur im Folgenden kurz erläutert wird.

6.2.1 Das Plasmid pXGH-1 (Goodman, 1985)

Das Plasmid pXGH-1 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. M. Goodman (MGH, Boston, USA), zur Verfügung gestellt. Die in Abb. 16 dargestellte Struktur des Plasmids, mit Angaben der Schnittstellen *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI, *Bgl*II/*Bam*HI, sowie den Anteilen von BPV-1, mMT-I, hGH und pBR327 wurden von Goodman (1985) übernommen. Alle weiteren Strukturen (z. B. λ gt11_{WES}) und Schnittstellen (z. B. *Bgl*II, *Pvu*II, *Sac*I, *Bgl*III), auch in Abb. 18 wurden durch eigene Sequenz- und Restriktionsanalysen, sowie Hybridisierungsexperimente ermittelt.

pXGH-1 (9,31 kb) besteht aus Teilen des bovinen Papilloma Virus Typ 1 (BPV-1), Bereichen aus pBR327 und einem Fusionsgenkonstrukt MThGH (Abb. 16).

Der Anteil des BPV-1 erstreckt sich von der *Eco*RI-Schnittstelle am 5'-Ende des MThGH bis zur *Bam*HI-Ligationsstelle zum Plasmid pBR327. Er umfaßt 2,35 kb und beinhaltet 56 % der BPV-1 69T Region. Eine *Kpn*I-Schnittstelle befindet sich 1,35 kb stromaufwärts zur Insertion.

Die Transformier- und Amplifizierbarkeit von pXGH-1 in *E. coli* ist durch ein 2,96 kb *Eco*RI/*Bam*HI-Fragment aus pBR327 gewährleistet. Es enthält den Ursprung der DNA-Replikation (*ori*) und das *Ap*^R-Gen. Der Vektoranteil des Plasmids beträgt somit 5,31 kb.

Der Rest (4,0 kb) von pXGH-1 wird durch ein Genkonstrukt, bestehend aus dem mMT-I Promotor (vgl. dazu Kap. 6.1.1), dem Wachstumshormon-Gen des Menschen (hGH) und 0,5 kb λ gt11_{WES}-DNA am 3'-Ende des Konstrukts, gebildet. Durch *Eco*RI-Spaltung läßt sich MThGH aus pXGH-1 isolieren. Die Hydrolyse von pXGH-1 mit *Kpn*I (4) liefert 2 Banden bei 6,81 kb und 2,5 kb. 4 Banden, bei 3,96 kb, 2,85 kb, 1,35 kb und 1,15 kb, entstehen durch Spaltung mit *Eco*RI und *Kpn*I (5). Ein internes 1,05 kb-Fragment aus hGH läßt sich durch Spaltung mit *Pvu*II darstellen (6).

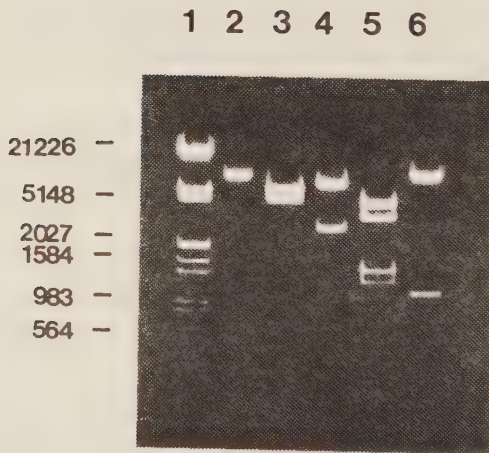
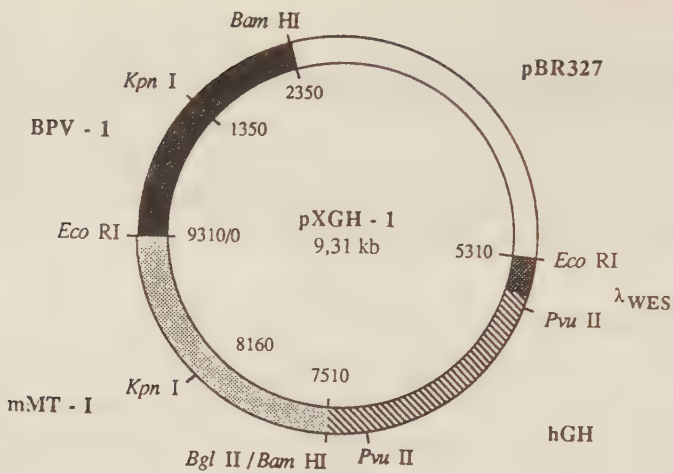
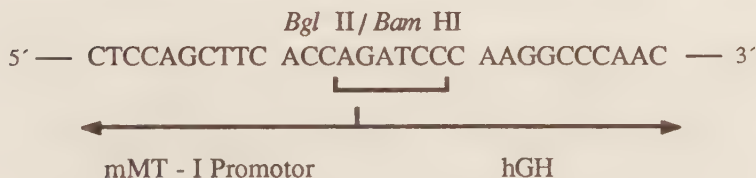
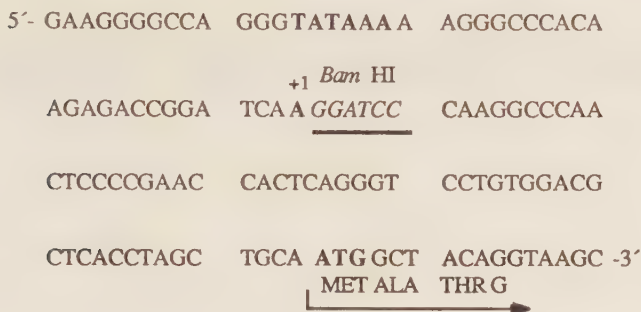


Abb. 16 : Struktur des Plasmids pXGH-1 (Goodman, 1985) und partielle Restriktionsanalyse
 Durch Hydrolyse mit *Eco*RI (3), *Kpn*I (4), *Eco*RI/*Kpn*I (5), *Pvu*II (6) und Auftrennung auf einem 0,8 %igen Agaroseverkalgel in Gegenwart von 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid wurden die wesentlichen Fragmente des pXGH-1 (2, ungespalten) dargestellt. Als GröÖenmarker diente mit *Eco*RI/*Hind*III gesplattene λ -DNA (1).

In pXGH-1 wurde im Gegensatz zu dem von Palmiter *et al.* (1983) mikroinjizierten MThGH 111 der mMT-I Promotor durch eine *Bgl*II/*Bam*HI-Ligation mit hGH fusioniert, ohne den Leserahmen zu verändern (Abb. 17 a, b).



Das Strukturgen hGH wurde aus einer menschlichen Plazenta DNA-Genbank zunächst als 2,6 kb *Eco*RI-Fragment isoliert (DeNoto *et al.*, 1981) und enthält deswegen am 3'-Ende bis zur *Eco*RI-Schnittstelle ein ungefähr 0,5 kb-Fragment des Phagen λ gt11WES. Von der 5'-Region wurde bis zur *Bam*HI-Schnittstelle ein 0,4 kb-Fragment entfernt. Abb. 18 gibt das für die Mikroinjektion präparierte 4,0 kb *Eco*RI-Fragment aus pXGH-1 mit wichtigen Signalsequenzen, Restriktionsschnittstellen und Fragmentlängen wieder.

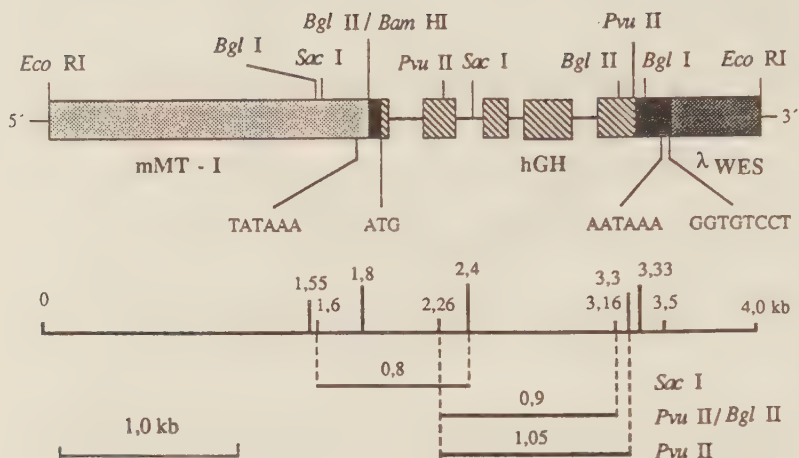


Abb. 18: Struktur des Genkonstrukts MThGH

Das für die Mikroinjektion verwandte 4,0 kb *EcoRI*-Fusionsgenkonstrukt aus pXGH-1 besteht aus dem 1,8 kb regulatorischen Bereich des mMT-I Promotors, der mit dem Strukturgen des menschlichen Wachstumshormon-Gens durch eine *BglII/BamHI*-Ligation fusioniert wurde. Am 3'-Ende des Konstrukts befindet sich ein ca. 0,5 kb-Fragment des Phagen λ gt11_{WES}. Kodierende Bereiche des hGH-Gens sind als schraffierte Boxen, Introns als Linien dargestellt. Schwarze Boxen geben die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche des hGH-Gens wieder. Das Start-, Stoppcodon und die Signale zur Polyadenylierung des hGH-Gens sind angegeben.

Durch Hydrolyse mit *SacI* läßt sich ein 0,8 kb-Fragment aus MThGH isolieren. Weiterhin sind die beiden Fragmente, die durch Spaltung mit *PvuII* (1,05 kb) und *PvuII/BglII* (0,9 kb) entstehen, angegeben.

Das Plasmid phMTII_AMx war ein Geschenk von Prof. Dr. Ch. Weissmann (ETH, Zürich). Alle Strukturen und Schnittstellen wurden von Ihm übernommen und nach seinen Angaben Abb. 19 und Abb. 20 angefertigt. Das Plasmid phMTII_AMx (8,1 kb) besteht aus dem Vektor SP⁶⁴/₆₅ (3,05 kb) und einem Genkonstrukt mit dem menschlichen Metallothionein II_A-Promotor als regulatorischem Element und den kodierenden Bereichen des Mx-Gens der Maus. Es läßt sich durch *Xba*I-Spaltung als 5,07 kb-Fragment aus dem Plasmid phMTII_AMx isolieren (Abb. 19).

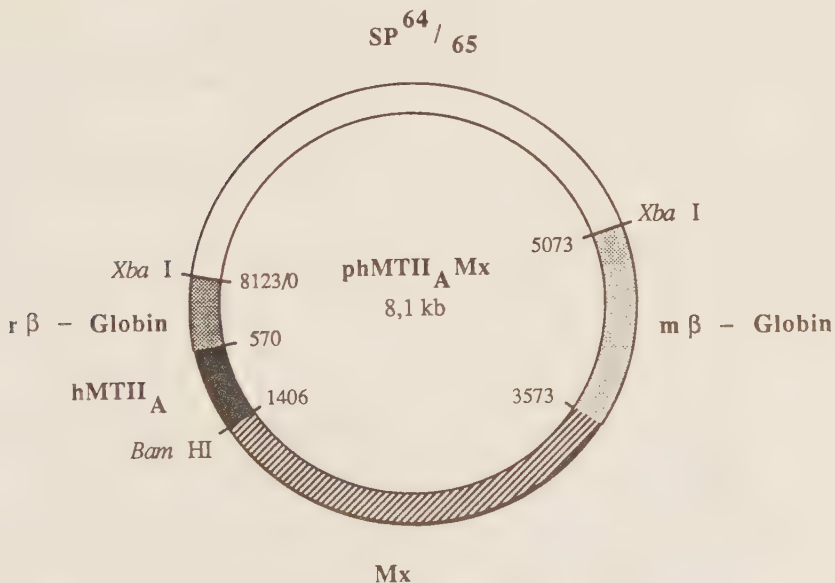


Abb. 19: Struktur des Plasmids phMTII_AMx (Weissmann, 1986)

Das Plasmid phMTII_AMx (8,1 kb) besteht aus dem Vektor SP⁶⁴/₆₅ (3050 bp) und einem Genkonstrukt, das sich aus Teilen des Kaninchen β-Globingens (570 bp, dunkelgrau), dem hMTII_A-Promotor (836 bp, schwarz), der MxcDNA (2167 bp, schraffiert) und einem Bereich aus dem Maus β-Globingen (1500 bp, hellgrau) zusammensetzt. Die Schnittstellen für einige Restriktionsenzyme (*Xba*I, *Bam*HI) sind angegeben.

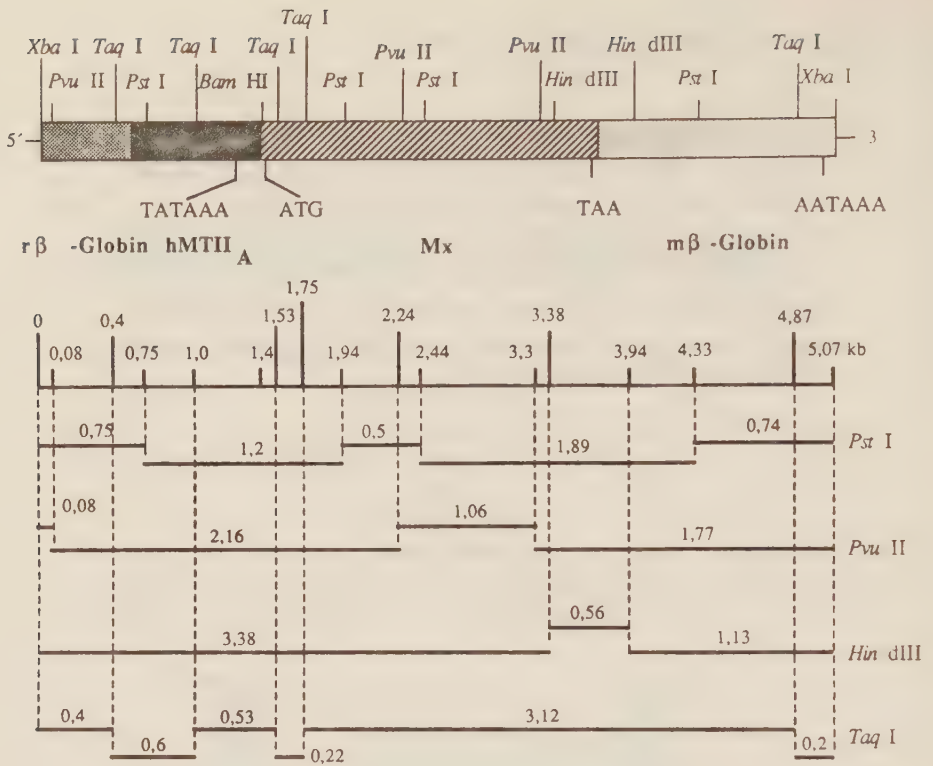


Abb. 20 : Aufbau des Genkonstrukts hMTII_AMx und Spaltungsmuster der Restriktionsendonukleasen *Pst*I, *Pvu*II, *Hind*III und *Taq*I sowie die Fragmentlängen bei Hydrolyse mit *Hind*III/*Pst*I, *Hind*III/*Pvu*II und *Pvu*II/*Pst*I

Das 5,07 kb *Xba*I-Fragment hMTII_AMx besteht aus 570 bp des β-Globingens des Kaninchens (dunkelgrau), 836 bp MTII_A-Promotor des Menschen (schwarz), 2167 bp *Mx*cDNA (schraffiert) und 1500 bp des β-Globingens der Maus (hellgrau). Wichtige Expressionssignale (TATA-Box, Start- und Stoppcodon, AATAAA-Signal) sind angegeben.

Durch Spaltung mit *Pst*I erhält man 5 Fragmente mit 497 bp, 740 bp, 749bp, 1202bp und 1882bp.

Die Hydrolyse mit *Pvu*II liefert 4 Fragmente bei 88 bp, 1058bp, 1770bp und 2154bp.

Die *Hind*III-Spaltung ergibt 3 Fragmente bei 559bp, 1126bp und 3385bp.

*Hind*III/*Pst*I: 0,39 kb; 0,5 kb; 0,56 kb; 0,74 kb;
0,75 kb; 0,94 kb; 1,2 kb

*Hind*III/*Pvu*II: 0,08 kb; 0,08 kb; 0,56 kb; 1,06 kb;
1,13 kb; 2,16 kb

*Pvu*II/*Pst*I: 0,08 kb; 0,2 kb; 0,3 kb; 0,67 kb; 0,74 kb;
0,86 kb; 1,03 kb; 1,2 kb

Die 5'-Region des hMTII_AMx wurde aus einem Teil des β -Globingens des Kaninchens (570 bp) und dem menschlichen Metallothionein-II_A Promotor (836 bp) (vgl. dazu Kap. 6.1.1) zusammengesetzt. Dieser Teil ist dann in einer *Bam*HI-Schnittstelle mit der MxcDNA ligiert. Die MxcDNA umfaßt 2167 bp des pMx34 von Position +147 bis +2314. 3'-Expressionssignale stammen von dem β -Globingen der Maus (1500 bp) (Abb. 20).

6.3.1 Maus

Das Genkonstrukt MThGH wurde in Mauszygoten injiziert.

Nach Mikroinjektionen wurden 28 Tiere geboren (Nr. 72, 75, 92, 101, 111, 211, 411-1911 und 6 Tiere aus einem Wurf der Maus Nr. 68).

16 untersuchte Tiere (Nr. 211-I-1/3-9, 211-II-1/3/4/6-9, 211-III-1) stammten aus drei Würfen mit insgesamt 20 Nachkommen der Maus Nr. 211. 11 Tiere (Nr. 122-1, 123-1, 123-2, 232-239) waren Nachkommen der Maus Nr. 111. Insgesamt wurden 55 Mäuse auf Integration der Fremd-DNA durch Southern Blot- und Dot Blot-Analyse untersucht.

Die DNA der zu untersuchenden Tiere wurde aus Gewebeproben der Schwanzspitze und der Milz gewonnen. Bei Totgeburten wurde der gesamte Embryo und bei den Tieren Nr. 511 und Nr. 611 wurden auch verschiedene Organe zur Gewinnung der DNA verwandt (vgl. dazu Kap. 4.6.1) und einer Restriktionsanalyse unterzogen.

Zunächst erfolgte eine *EcoRI*-Spaltung und Auftrennung der DNA in 1 %igen Agarosegelen. Anschließend wurde durch eine *PvuII*-Spaltung das interne 1,05 kb *PvuII*-Fragment aus hGH dargestellt. Dies ist ein eindeutiger Nachweis der Integration der MThGH Fremd-DNA ins Genom, da dieses *PvuII*-Fragment nur im hGH enthalten ist. Als Probe wurde bei allen Mäusen ausschließlich das interne 0,9 kb *PvuII/BgIII*-Fragment aus hGH (hGH₉₀₀) verwandt. Dies garantierte eine hohe Spezifität der Hybridisierung unter stringenten Bedingungen und vermied das Problem der starken Kreuzhybridisierung des mMT-I Promotors mit repetitiven, endogenen Sequenzen der Maus.

Bei den nach Mikroinjektionen geborenen Mäusen konnten 8 als Träger des mikroinjizierten Gens identifiziert werden. Tier Nr. 211 hatte 4 Kopien des MThGH-Konstrukts integriert. In 7 Tieren war nur eine Kopie des MThGH unter Verlust der 5'- und 3'-*EcoRI*-Schnittstellen des Konstrukts durch Ligation mit chromosomaler DNA integriert. Bei Tier Nr. 511 wurde kontrolliert, ob eventuell eine Integration erst im mehrzelligen Stadium stattgefunden hat und ein Mosaik entstanden war. Aus diesem Grund wurde aus mehreren Organen DNA isoliert und mit *EcoRI* und *PvuII* gespalten.

Die Spaltung mit *EcoRI* ergab ein sehr schwaches Signal über dem Hintergrund im hochmolekularen Bereich (Ergebnisse nicht gezeigt), während die *PvuII*-Spaltung ein deutliches Signal bei 1,05 kb lieferte (Abb. 21).

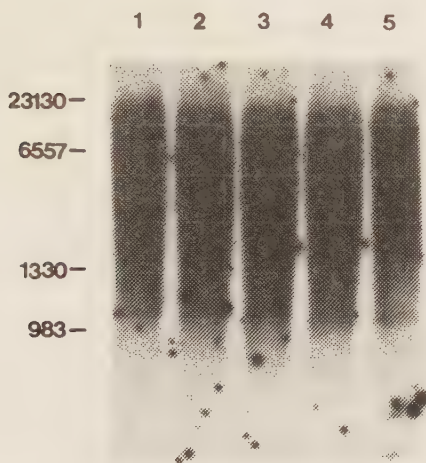


Abb. 21 : Southern Blot-Analyse der Maus Nr. 511

30 µg genomische DNA aus dem Herz (1), der Leber (2), der Niere (3), dem Gehirn (4) und der Milz (5) von Nr. 511 wurden mit *PvuII* gespalten und auf einem 1,0 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Hybridisierung mit dem 0,9 kb *PvuII/BglII*-Fragment aus hGH (hGH900) wurde der Filter 24 Stunden bei -80 °C mit einer Verstärkerfolie exponiert.

Bei Tier Nr. 911 läßt sich durch *EcoRI*-Spaltung eine Bande bei > 5,2 kb erkennen (Abb. 22). Die Hydrolyse mit *PvuII* führt zu der erwarteten 1,05 kb-Bande (Ergebnis nicht gezeigt).

Bei diesem Tier wurde mittels Dot Blot-Analyse errechnet, daß nur eine Kopie ins Genom integriert war. Die Randschnittstellen sind bei der Integration verloren gegangen.

Die gleiche Situation ergab sich bei den Tieren Nr. 811, 1211 und 1811 (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch die Integration einer einzigen Kopie von MThGH entsteht bei *EcoRI*-Spaltung eine schwache Bande bei >5,2 kb, während die *PvuII*-Spaltung ein Signal bei 1,05 kb liefert.

Zwei weitere Mäuse, die pränatal verendet waren, wurden ebenfalls als Transgene identifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt) und hatten je eine Kopie integriert.

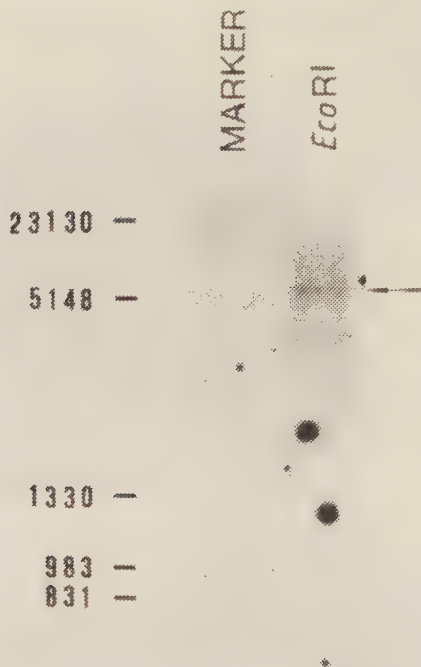


Abb. 22 : Southern Blot-Analyse der Maus Nr. 911

30 µg genomische DNA aus der Schwanzspitze wurde mit *EcoRI* gespalten, auf einem 1,0 %igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit dem 0,9 kb *PvuII/BglIII*-Fragment aus hGH (hGH₉₀₀) hybridisiert. (Expositionsdauer 18 Stunden)

Ein anderes Southern Blot-Restriktionsmuster zeigte die Maus Nr. 211. Durch die Spaltung mit *EcoRI* entstanden 2 Banden bei 4,0 kb und >20 kb (Abb. 23, 1). Die Bande bei 4,0 kb ist bei der Integration mehrerer Kopien zu erwarten und entspricht der Länge des gesamten, mikroinjizierten Konstrukts. Da der Mausbock Nr. 211 eine hohe Expression (> 24 ng hGH/ml Serum) und deutlich vermehrtes Größenwachstum aufwies, wurde er angepaart, und die Nachkommen wurden im Folgenden untersucht. Bei der Spaltung mit *EcoRI* (Abb. 23 (2); 24 a; 25 a) entstehen drei Restriktionstypen im Southern Blot.

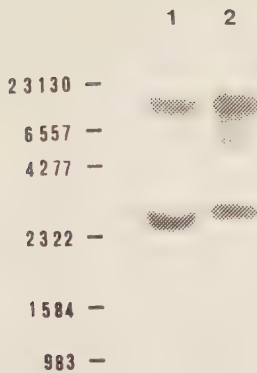


Abb. 23 : Southern Blot-Analyse der Maus Nr. 211 und 211-I-4
Jeweils 30 µg DNA der Mäuse Nr. 211 (1) und 211-I-4 (2) wurden mit *EcoRI* gespalten, auf einem 1,0 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter übertragen.
Hybridisierung mit hGH₉₀₀; Expositionsdauer: 2 Tage.
Größenmarker: λ-DNA, gespalten mit *HindIII* und *EcoRI*

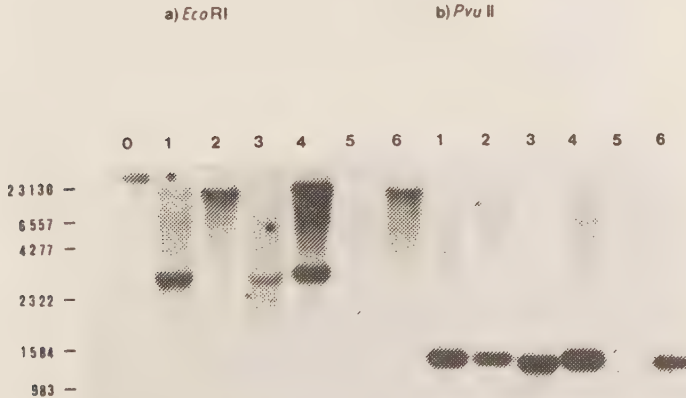


Abb. 24 : Southern Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211
Jeweils 30 µg DNA der Mäuse Nr. 211-I-3 (1), 211-I-5 (2), 211-I-7 (3), 211-II-3 (4) und 211-III-1 (6) sowie einer Kontrolle (5) wurden mit *EcoRI* (a) und *PvuII* (b) gespalten, auf einem 1,0 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter übertragen.
Hybridisierung mit hGH₉₀₀;
Expositionsdauer: 26 Stunden.
Größenmarker: λ-DNA, gespalten mit *HindIII* und *EcoRI* (0).

Nr. 211-I-3 (Abb. 24, 1 a) und 211-I-7 (Abb. 24, 3 a) zeigen eine Bande bei 4,0 kb. Nr. 211-I-5 (Abb. 24, 2 a), 211-II-7 (Abb. 25, 2 a) und 211-III-1 (Abb. 24, 6 a) haben ebenfalls nur eine Bande, jedoch bei > 20 kb. Bei Tier Nr. 211-II-3 (Abb. 24, 4 a), 211-II-4 (Abb. 25 1 a) und 211-I-4 (Abb. 23, 2) sind zwei Banden bei 4,0 kb und > 20 kb zu sehen.

Durch *Pvu*II-Spaltung entsteht bei allen Mäusen eine Bande bei 1,05 kb (Abb. 24 b; 25 b). Die Intensität der Banden variiert jedoch je nach Restriktionstyp. Vergleichbar sind dabei wiederum Nr. 211-I-3 (Abb. 24, 1 b) mit 211-I-7 (Abb. 24, 3 b) und Nr. 211-I-5 (Abb. 24, 2 b) mit 211-III-1 (Abb. 24, 6 b). Die anderen *Pvu*II-Spaltungen können nicht direkt miteinander verglichen werden, da es sich um verschiedene Southern Blot-Analysen handelt. (Die Ergebnisse von Nr. 211 und 211-I-4 sind nicht gezeigt).

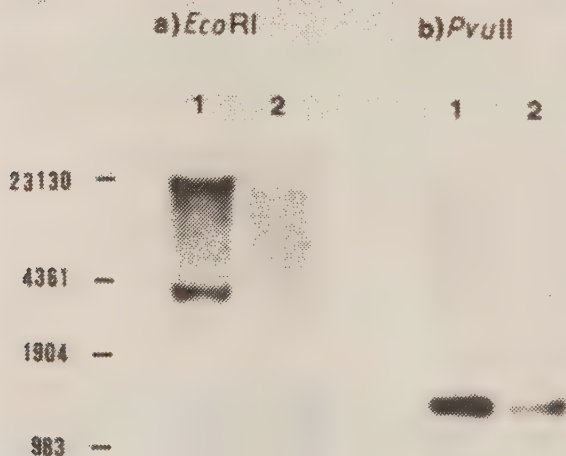


Abb. 25: Southern Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211
Jeweils 30 µg DNA der Mäuse Nr. 211-II-4 (1) und 211-II-7 (2) wurden mit *Eco*RI (a) und *Pvu*II (b) gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit hGH900 hybridisiert.

Expositionsdauer: 20 Stunden.

Größenmarker: λ-DNA, gespalten mit *Hind*III und *Eco*RI.

Durch *Bgl* II-Verdauung sollte eine weitere Klärung der Integrationsweise herbeigeführt werden. Hierbei entstanden zwei Gruppen von Restriktionstypen (Abb. 26).

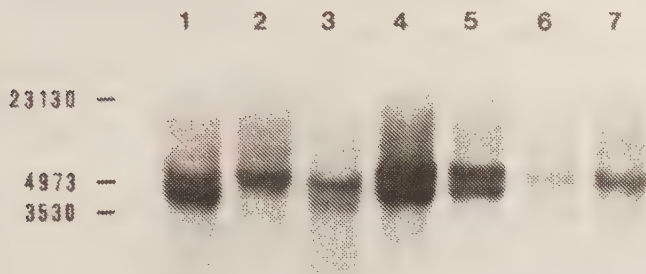


Abb. 26 : Southern Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211
Jeweils 30 µg DNA der Mäuse Nr. 211-I-3 (1), 211-I-5 (2), 211-I-7 (3), 211-II-3 (4), 211-II-4 (5), 211-II-7 (6) und 211-III-1 (7) wurden mit *Bgl*II gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.
Expositionsdauer: 20 Stunden.
Größenmarker: λ-DNA, gespalten mit *Hind*III und *Eco*RI.

Tiere, die in der *Eco*RI-Spaltung entweder eine Bande bei 4,0 kb (Nr. 211-I-3 und 211-I-7) oder zwei Banden bei 4,0 kb und > 20 kb (Nr. 211-II-3 und 211-II-4) aufwiesen, haben durch Hydrolyse mit *Bgl*II eine Doppelbande bei 4,0 kb und > 5,2 kb. Tiere mit einer Bande >20 kb bei der Hydrolyse mit *Eco*RI (Nr. 211-I-5, 211-II-7 und 211-III-1) besitzen nur die obere Bande > 5,2 kb. Eine geschlechtsgebundene Verteilung des Bandenmusters ist nicht ersichtlich.

Mittels Dot Blot-Analyse wurden die ins Genom integrierten Kopien von MThGH errechnet (Abb. 27) und in Tabelle 3 wiedergegeben (vgl. dazu Anmerkungen in Kap. 5.4.3.1).

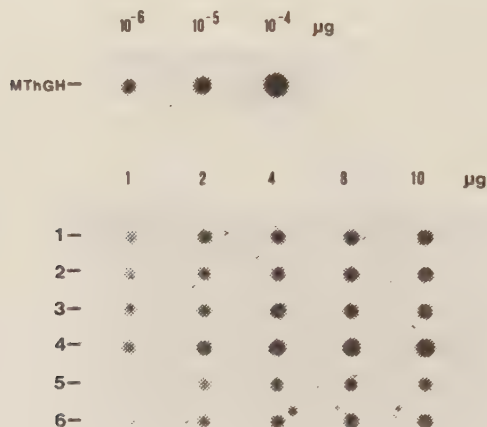


Abb. 27 : Dot Blot-Analyse der Nachkommen von Maus Nr. 211 zur Bestimmung der Anzahl der Kopien/Zelle

Jeweils 1, 2, 4, 8 und 10 µg DNA der Mäuse Nr. 211-I-3 (1), 211-I-5 (2), 211-I-7 (3), 211-II-3 (4), Kontrolle (5) und 211-III-1 (6) wurden zusammen mit 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} µg MThGH in 10 µg Lachssperma-DNA mit einer Bio Rad Bio-Dot™ Apparatur auf Nitro-zellulosefilter aufgetragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.

Expositionsdauer: 16 Stunden.

Nach der Exposition wurden die "Dots" ausgeschnitten und im Szintillationszähler gemessen.

Vater	211						
Wurf	I			II			III
Tier Nr.	3	5	7	3	4	7	1
Geschlecht	m	m	w	m	m	w	m
Kopien/Zelle	3	1	3	4	ND	ND	1
m : Männlich w : Weiblich ND : Nicht ermittelt							

Tab. 3 : Integrierte Kopien/Zelle bei den Nachkommen von Maus Nr. 211
Aus den Meßwerten der Dot Blot-Analyse wurde die Zahl der ins Genom integrierten Kopien/Zelle, unter Zugrundelegung einer haploiden Genomgröße von 3×10^6 kb, errechnet.

6.3.2 Kaninchen

Die Erstellung transgener Kaninchen erfolgte durch Mikroinjektion des Genkonstrukts MThGH.

Insgesamt 39 totgeborene, verendete oder lebende Kaninchen, die aus direkten Mikroinjektionen entstanden waren, wurden mittels Southern Blot- und Dot Blot-Analyse auf Integration der Fremd-DNA untersucht.

Weiterhin wurden 20 Kaninchen (Nr. 173-185; Nr. 223-229), die Nachkommen des Rammlers Nr. 81 waren, analysiert.

DNA der Tiere (Nr. 062/7, 9, 14; Nr. 26, 29-38, 79-81; Nr. 121, 122; Nr. 102-105; Nr. 18/5) und der Nachkommen von Nr. 81 wurde aus Gewebe der Schwanzspitze, Blut oder Lebergewebe isoliert (vgl. dazu Kap. 4.6.2).

Dabei wurden 9 transgene Tiere identifiziert. In einer *EcoRI*-Spaltung der DNA der Tiere Nr. 79 (Abb. 28, 3), 80 (Abb. 28, 4), 26 (Abb. 28, 1) und 38 (Abb. 28, 2) und Nr. 81 (Abb. 29, 1) sind schwache Banden bei den Tieren Nr. 79-81 im hochmolekularen Bereich zu sehen, während bei Nr. 26 und 38 ein Signal bei 4,0 kb zu erkennen ist.

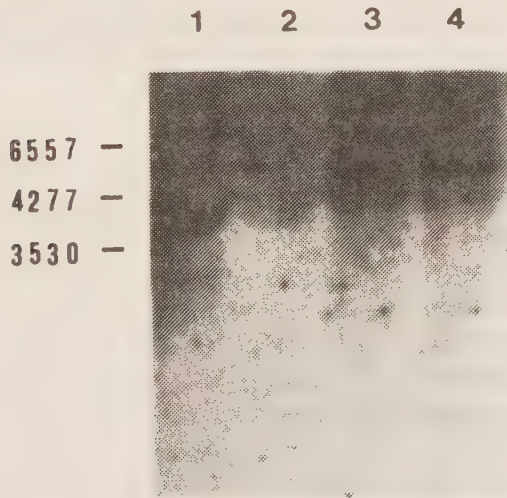


Abb. 28 : Southern Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 79-80, 26 und 38
Jeweils 30 µg DNA der Kaninchen Nr. 26 (1), 38 (2), 79 (3) und 80 (4) wurden mit *EcoRI* gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.

Expositionsdauer: 2 Tage

Durch Spaltung mit *PvuII* läßt sich bei allen Tieren eine Bande bei 1,05 kb darstellen (Abb. 29, 2-7) und bei Nr. 18/5 (Abb. 29, 7) zwei weitere, schwächere im 4,5 kb-Bereich.

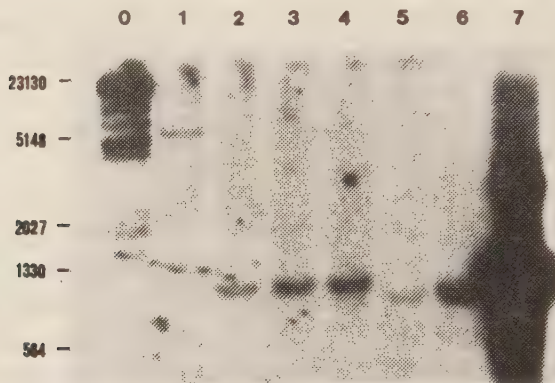


Abb. 29 : Southern Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 18/5, 79-81, 26 und 38

Jeweils 30 µg DNA der Kaninchen Nr. 81 (1), 79 (2), 80 (3), 81 (4), 26 (5), 38 (6) und 18/5 (7) wurden mit *EcoRI* (1) bzw. *PvuII* (2-7) gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.

Expositionsdauer: 2 Tage

Auf Grund der starken Signale bei Nr. 18/5, die auf die Integration mehrerer Kopien des MThGH hinweisen, wurde eine genauere Southern Blot-Restriktionsanalyse vorgenommen (Abb. 30).

Als Probe diente wie in allen anderen Fällen das interne 0,9 kb *PvuII*/*BglII*-Fragment aus hGH. Die Spaltungen mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *KpnI* und *BglII*, die eine Schnittstelle im Konstrukt haben, führen zu einer Bande bei 4,0 kb und zwei schwächeren Banden im hochmolekularen Bereich. Diese laufen in jedem Spaltungsansatz auf unterschiedlicher Höhe.

Durch *SacI*-Spaltung entstehen vier Banden. Da *SacI* zwei Erkennungsstellen im Konstrukt hat, wird ein Fragment bei 0,8 kb gebildet (vgl. dazu Abb. 18). Die starke obere Bande liegt deshalb, um diesen Betrag gemindert, etwas tiefer als bei der *BglII*- oder *KpnI*-Spaltung. Die beiden weiteren Signale im hochmolekularen Bereich entsprechen denen der anderen Spaltungen. *PvuII*, ebenfalls ein Restriktionsenzym, das zwei Schnittstellen im MThGH hat, liefert die erwartete Bande bei 1,05 kb und zwei weitere, schwächere Banden bei 3,2 kb und 4,0 kb.

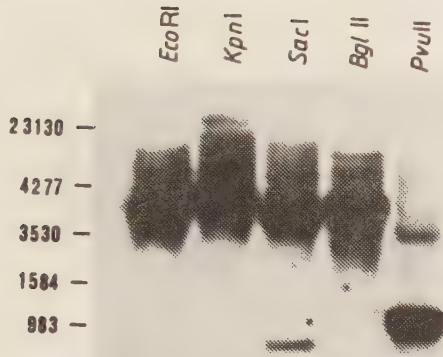


Abb. 30 : Southern Blot-Analyse des Kaninchens Nr. 18/5

Jeweils 30 µg DNA des Kaninchens Nr. 18/5 wurden mit den angegebenen Restriktions-
endonukleasen gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitro-
zellulosefilter übertragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.

Expositionsdauer: 14 Stunden

Weiterhin wurde bei drei Kaninchen Nr. 062/7, 9 und 14 eines Wurfs MThGH-Integration nachgewiesen. Durch Spaltung mit *EcoRI*, *PvuII* und *BglII* ergaben sich bei den Tieren unterschiedliche Bilder (Abb. 31).

Tier Nr. 062/7 zeigt bei der Hydrolyse mit *EcoRI* (Abb. 31, 1) eine starke Bande bei 4,0 kb, eine schwächere bei >4,4 kb und ein schwach sichtbares Signal bei 7 bis 8 kb. Durch *PvuII*-Spaltung (Abb. 31, 2) läßt sich eine starke Bande bei 1,05 kb bilden. Zusätzlich ist ein schwaches Signal bei 7 bis 8 kb zusehen. Die *BglII*-Spaltung (Abb. 31, 3) liefert drei von oben nach unten an Intensität nachlassende Banden von 6,3 kb, > 4,3 kb und 4,0 kb.

Durch Spaltung der DNA des Tieres Nr. 062/9 (Abb. 31, 4-6) mit den oben erwähnten Restriktionsenzymen entsteht ein dem Tier Nr. 062/7 vergleichbares Bandenmuster. Die Intensität der Banden aller Verdauungsansätze ist jedoch größer.

Nr. 062/14 (Abb. 31, 7-9) zeigt dagegen in jedem Spaltungsansatz nur eine Bande. Bei *EcoRI*-Spaltung bei 4,0 kb (7), bei *PvuII* bei 1,05 kb (8, in der Abbildung nicht sichtbar) und bei *BglII* bei 7 bis 8 kb (9). Die Banden sind nur sehr schwach gegenüber denen der anderen Tiere.

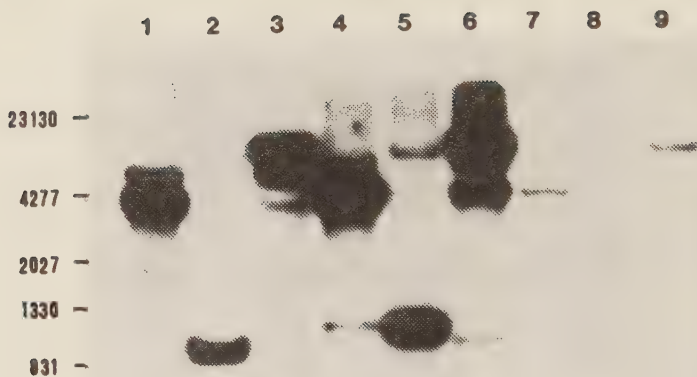


Abb. 31 : Southern Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 062/7, 062/9 und 062/14

Jeweils 30 µg DNA der Kaninchen Nr. 062/7, 062/9 und 062/14 wurden mit *Eco*RI, *Pvu*II und *Bgl*II gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.

Expositionsdauer: 24 Stunden.

	062/7	062/9	062/14
<i>Eco</i> RI	1	4	7
<i>Pvu</i> II	2	5	8
<i>Bgl</i> II	3	6	9

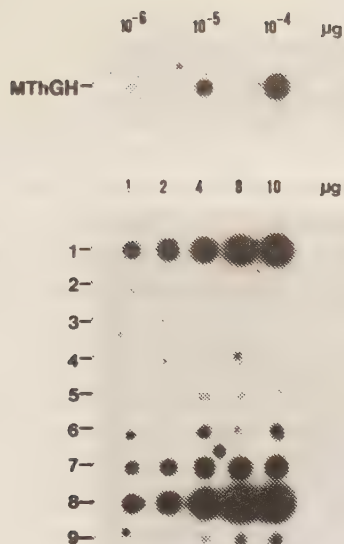


Abb. 32 : Dot Blot-Analyse der Kaninchen Nr. 18/5, 79-81, 26, 38, 062/7, 062/9 und 062/14 zur Bestimmung der Anzahl der Kopien/Zelle. Jeweils 1, 2, 4, 8 und 10 µg DNA der Kaninchen Nr. 18/5 (1), 26 (2), 38 (3), 79 (4), 80 (5), 81 (6), 062/7 (7), 062/9 (8) und 062/14 (9) wurden zusammen mit 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} µg MThGH in 10 µg Lachssperma-DNA mit einer Bio Rad Bio-Dot™ Apparatur auf Nitrozellulosefilter aufgetragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.

Expositionsdauer: 16 Stunden.

Nach erfolgter Exposition wurde der Filter mit einem Scanner (Berthold) gemessen.

Tier Nr.	062/7	062/9	062/14	18/5	26	38	79	80	81
Kopien/Zelle	20	69	1	39	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3

Tab. 4 : Integrierte Kopien/Zelle bei den Kaninchen Nr. 18/5, 79-81, 26, 38, 062/7, 062/9 und 062/14

Aus den Meßwerten der Dot Blot-Analyse wurde die Zahl der ins Genom integrierten Kopien/Zelle, unter Zugrundelegung einer haploiden Genomgröße von 3×10^6 kb, errechnet.

Bei der Untersuchung der Nachkommen von Nr. 81 konnte keine Integration nachgewiesen werden.

6.3.3 Schwein

Sowohl nach Injektion des Konstrukts MThGH als auch hMTII_AMx konnten transgene Schweine erstellt und nachgewiesen werden.

6.3.3.1 Nachweis der Integration von MThGH

28 aus Mikroinjektionen entstandene Schweine wurden durch Southern Blot- und Dot Blot-Analyse untersucht. Bei 10 Schweinen konnte die Integration des MThGH-Genkonstrukts im Southern Blot nachgewiesen werden.

DNA dieser Tiere wurde aus Gewebe der Schwanz- oder Ohrspitze und aus Blut isoliert (vgl. dazu Kap. 4.6.3) und einer Restriktionsanalyse unterzogen.

Durch *Eco*RI-Spaltung ist bei allen Trägern des MThGH-Konstrukts ein deutliches, von Tier zu Tier unterschiedlich starkes Signal bei ca. 4,0 kb zusehen (Abb. 33). Die Randschnittstellen des Konstrukts blieben erhalten. Als Hybridisierungsprobe wurde das Plasmid pXGH-1 (Abb. 33, 1 nach Hydrolyse mit *Eco*RI) verwandt. Durch den λ gt11_{WES}-Anteil von pXGH-1 hybridisiert gleichzeitig die als Größenmarker dienende *Hind*III und *Eco*RI gespaltene λ -DNA (Abb. 33, 2).



Abb. 33 : Southern Blot-Analyse der Schweine Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481, 482 und 483

Jeweils 30 μ g DNA der Schweine Nr. 643-2 (4), 643-3 (5), 643-4 (6), 477 (7), 481 (11), 482 (12) und 483 (13) wurden mit *Eco*RI gespalten, nach einer 0,8 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen und mit dem nicktranslatierten pXGH-1 hybridisiert.

(1) pXGH-1, gespalten mit *Eco*RI

(2) Größenmarker: λ -DNA, gespalten mit *Hind*III und *Eco*RI.

(3), (8)-(10) Kontrollen.

Mit *PvuII* läßt sich aus der DNA das 1,05 kb hGH-Fragment isolieren und ist bei allen Tieren in Abb. 34 nachweisbar. Da die Spaltung der DNA des Schweines Nr. 477 (Abb. 34, 4) und Nr. 483 (Abb. 34, 7) unvollständig war, sind die Banden bei dieser Tiere 1,05 kb sehr schwach und laufen etwas höher als bei den anderen Schweinen. Als Probe diente das 0,9 kb *PvuII*/*Bgl*II-Fragment aus hGH (hGH₉₀₀).

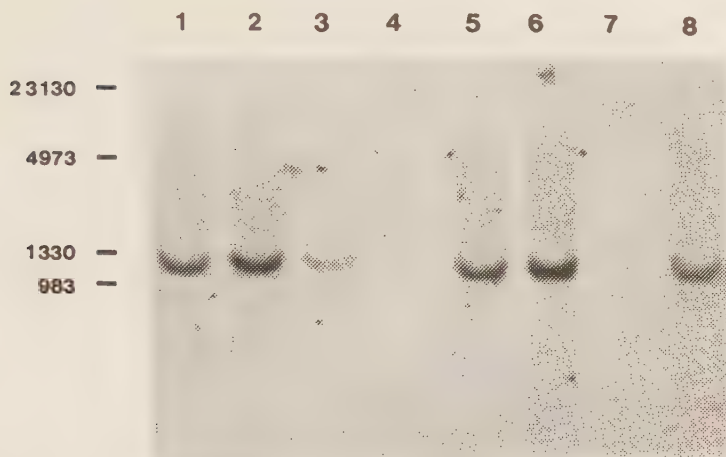


Abb. 34 : Southern Blot-Analyse der Schweine Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481-I, 481-II, 483 und 2267

Jeweils 30 µg DNA der Schweine Nr. 643-2 (1), 643-3 (2), 643-4 (3), 477 (4), 481-I (5), 481-II (6), 483 (7) und 2267 (8) wurden mit *PvuII* gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen und mit hGH₉₀₀ hybridisiert.

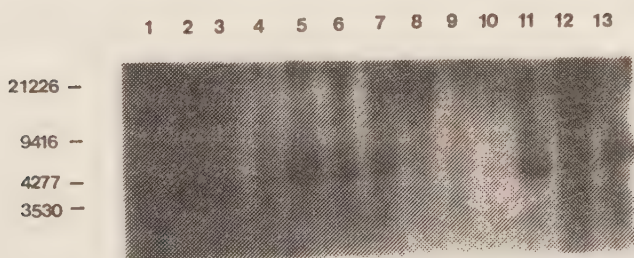


Abb. 35 : Southern Blot-Analyse der Schweine Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481, 482 und 483

Jeweils 30 µg DNA der Schweine Nr. 643-2 (4), 643-3 (5), 643-4 (6), 477 (7), 481 (11), 482 (12) und 483 (13) wurden mit *KpnI* gespalten, nach einer 0,8 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und pXGH-1 hybridisiert.

(1) pXGH-1, gespalten mit *EcoRI*; (2) Größenmarker: λ -DNA, gespalten mit *HindIII* und *EcoRI*; (3), (8)-(10) Kontrollen.

Auch bei Spaltung mit *Kpn*I, das nur eine Restriktionserkennungsstelle im Konstrukt hat, entsteht ein Signal bei 4,0 kb (Abb. 35). Wie in Abbildung 33 wurde mit pXGH-1 hybridisiert.

Durch Dot Blot-Analyse (vgl. dazu Anmerkungen in Kap. 5.4.3.1) wurden die Kopiezahlen /Zelle bestimmt (Tab. 5).

Tier Nr.	643-2	643-3	643-4	477	481-II	482	483
Kopien/Zelle	6	4	2	5	8	14	2

Tab. 5 : Integrierte Kopien/Zelle bei den Schweinen Nr. 643-2, 643-3, 643-4, 477, 481-II, 482 und 483

Aus den Meßwerten der Dot Blot-Analyse wurde die Anzahl der ins Genom integrierten Kopien/Zelle, unter Zugrundelegung einer haploiden Genomgröße von 3×10^6 kb, errechnet.

6.3.3.2 Nachweis der Integration von hMTII_AMx

Die Untersuchung auf Integration des Konstrukts hMTII_AMx wurde bei 8 lebenden Schweinen und 9 Schweinefeten geführt. Bei 4 Tieren konnte die Integration des Konstrukts bzw. das Vorhandensein homologer Sequenzen gezeigt werden. Auf Grund der zum Teil sehr komplexen Integrationsweise wird im Folgenden jedes Tier einzeln besprochen.

Der Schweinefetus Nr. 871-2 weist das einfachste Integrationsmuster auf.

Als Probe diente ein 1,9 kb *Bam*HI/*Hind*III-Fragment aus Mx (Mx_{1,9}). Nach Spaltung mit *Xba*I (Abb. 36) imponiert ein starkes Signal bei 5,0 kb und zwei schwächere Banden im hochmolekularen Bereich. Diese beiden Banden resultieren aus den Randfragmenten. Durch den Verlust der *Xba*I-Erkennungssequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende der Integrationsstelle haftet den äußeren Konstrukten genomische DNA an. Die Bande bei 5,0 kb entspricht der Länge des injizierten Konstrukts. Die Hydrolyse mit *Pvu*II liefert 2 starke Banden bei 1,06 kb und 2,16 kb und eine schwächere bei 1,9 kb. Die starken Banden stammen aus dem mittleren Bereich des Konstrukts, während sich das 1,9 kb-Fragment aus Teilen des 3'-Endes des einen Konstrukts und den 0,08 kb der 5'-Region des darauf folgenden zusammensetzt. Diese Bande erscheint schwächer als die beiden anderen, da sie nur 800 bp mit der zur

Hybridisierung verwandten Probe überlappt. 3 Banden entstehen bei Spaltung mit *Pst*I, und zwar bei 0,497 kb, 1,2 kb und 1,89 kb (Abb. 36). Sie sind aus dem Spaltungsmuster des Konstrukts zu erwarten.

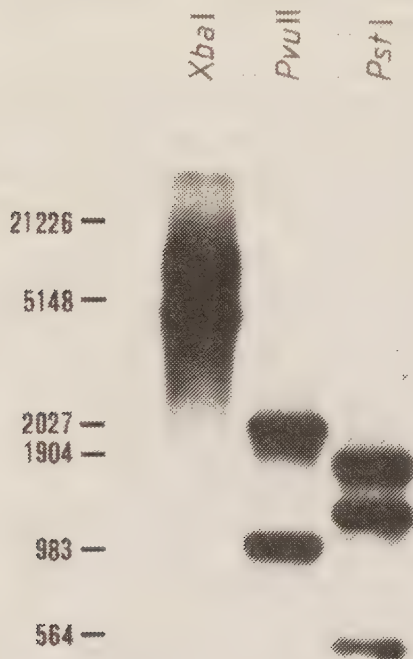


Abb. 36 : Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 871-2

Jeweils 30 µg DNA des Schweines Nr. 871-2 wurden mit den angegebenen Restriktions-enzymen gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit *Mx*_{1,9} hybridisiert.

Expositionsdauer: 6 Stunden

Alle Banden entsprechen denen, die man bei der Spaltung des hMTII_AMx-Genkonstrukts erwartet. Durch Dot Blot-Analyse wurde bei diesem Tier eine Kopienzahl/Zelle von 84 errechnet (Abb. 43).

Ein komplizierteres Integrationsschema, das mit Veränderungen des Konstrukts einhergeht, ist bei dem lebenden Schwein Nr. 257 zu erkennen (Abb. 37-Abb. 39). Die Spaltung mit *EcoRI* (Abb. 37) liefert ein Signal bei >20 kb. Dies ist zu erwarten, da *EcoRI* im Konstrukt keine Schnittstellen besitzt. Die Hydrolyse mit *EcoRI* dient gleichzeitig zur Kontrolle der tatsächlichen Integration.

Durch *HindIII*-Spaltung lassen sich 2 starke Banden bei 1,4 kb und 4,35 kb bilden. Weitere schwächere Banden sind bei >20 kb und 3,1 kb zu sehen. Erwartungsgemäß dürften bei einer "head to tail" Verkettung nur zwei Banden, eine schwache bei >20 kb und eine starke bei 4,5 kb, imponieren.

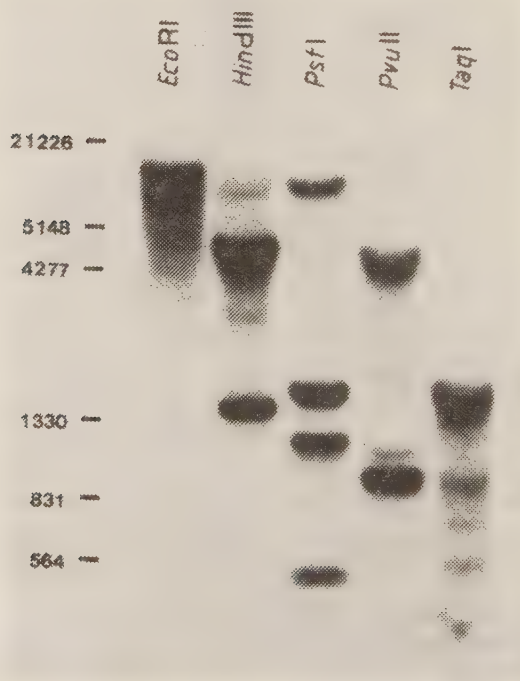


Abb. 37 : Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 257

Jeweils 30 µg DNA des Schweines Nr. 257 wurden mit den angegebenen Restriktions-
enzymen gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter
übertragen und mit Mx_{1,9} hybridisiert.

Expositionsdauer: 24 Stunden

Die Entstehung der 1,4 kb-Bande würde das Vorhandensein einer neuen *HindIII*-Schnittstelle im kodierenden Bereich des Mx-Gens bedeuten. Um dies auszuschließen, wurden Doppelverdauungsansätze vorgenommen (Abb. 38 und Abb. 39). Durch Hydrolyse mit *HindIII*/*PstI* (Abb. 38) entstehen 4 Banden.

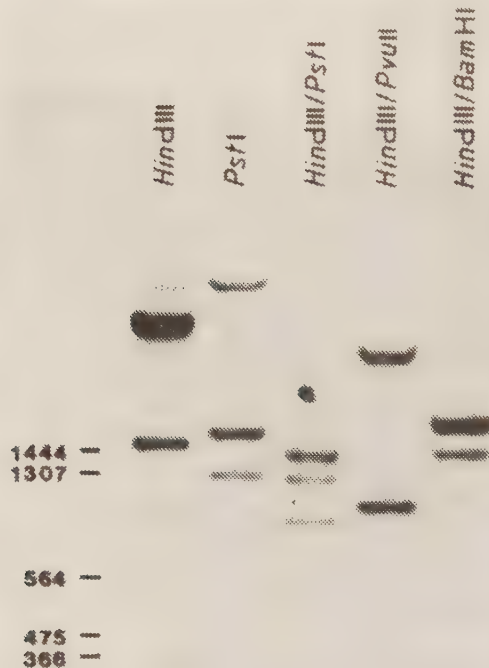


Abb. 38 : Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 257

Jeweils 30 µg DNA des Schweines Nr. 257 wurden mit den angegebenen Restriktions-enzymen gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit Mx₁g hybridisiert.

Expositionsdauer: 24 Stunden

Von diesen sind die unteren drei bei 0,497 kb (in der Abbildung nicht sichtbar), 0,94 kb und 1,2 kb aus dem Spaltungsmuster von hMTII_AMx herleitbar. Die vierte Bande bei 1,4 kb dagegen erscheint zusätzlich. Das Spaltungsmuster von *HindIII*/*PvuII* (Abb. 38) entspricht dem der *PvuII*-

Hydrolyse mit zwei Banden bei 1,06 kb und 3,9 kb (vgl. dazu Abb. 37 und 39). Dies entspricht nicht den Fragmentlängen, die man aus dem Konstrukt erwarten würde. Bei Spaltung mit *Hind*III/*Bam*HI (Abb. 38) sind zwei Signale bei 1,4 kb und 1,97 kb zu sehen. Die obere Bande entspricht dem zur Hybridisierung verwandten 1,97 kb *Bam*HI/*Hind*III-Fragment aus Mx, während die untere zusätzlich erscheint. Auch bei Hydrolyse mit *Pvu*II/*Pst*I (Abb. 39) lassen sich alle 5 Fragmente bei 1,2 kb, 1,03 kb, 0,85 kb, 0,3 kb und 0,2 kb, die man aus der Restriktionskarte von hMTII_AMx erwarten würde, darstellen (die Fragmente bei 0,2 kb und 0,3 kb sind in der Abbildung nicht sichtbar).

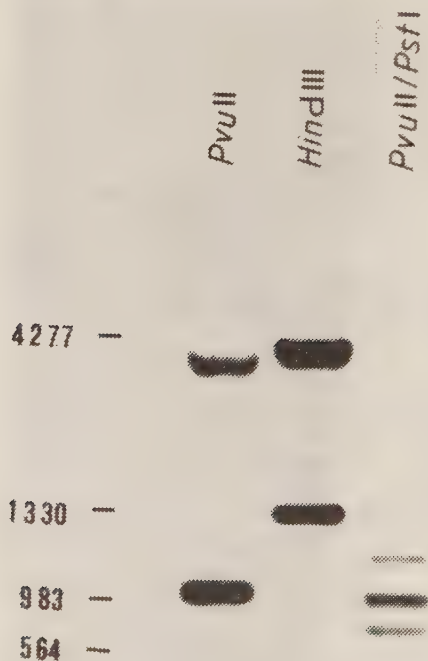


Abb. 39: Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 257

Jeweils 30 µg DNA des Schweines Nr. 257 wurden mit den angegebenen Restriktions-
enzymen gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter
übertragen und mit Mx₁g hybridisiert.

Expositionsdauer: 24 Stunden

Eine *Pst*I-Spaltung (Abb. 37 und Abb. 38) liefert 3 Banden bei 0,497 kb, 1,2 kb und 1,88 kb. Zusätzlich ist eine schwächere Bande bei >20 kb und ebenfalls ein sehr schwaches Signal unterhalb der 1,2 kb Bande zu sehen. Die obere Bande verschwindet bei Hydrolyse mit *Hind*III und *Pst*I (Abb. 38). Durch Spaltung mit *Pvu*II (Abb. 37 und 39) erhält man 2 Banden bei 1,06 kb und 3,9 kb. Dies entspricht nicht dem aus dem Restriktionsmuster des Konstrukts bekannten Bandenmuster. Eigentlich sollten zwei starke Banden bei 1,06 kb und 2,16 kb und eine schwächere Bande bei 1,9 kb zu sehen sein (vgl. dazu Abb. 36). Aus den vorhergegangenen Southern Blot-Analysen ist jedoch ersichtlich, daß alle in den regulatorischen und kodierenden Bereichen (Promotor, MxcDNA, 3'-Region) befindlichen Schnittstellen erhalten sind. Die Entstehung des 3,9 kb *Pvu*II-Fragments ist nur dann zu erklären, wenn die 0,08 kb vom 5'-Ende des Konstrukts entfernte *Pvu*II-Schnittstelle nicht mehr vorhanden ist und so das 3'-Ende des vorhergegangenen Fragments nicht abgespalten wird.

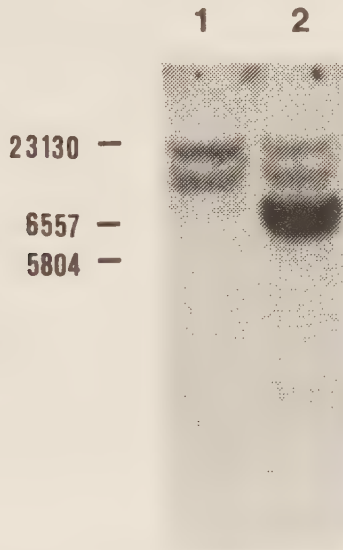


Abb. 40 : Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 252

Jeweils 30 µg DNA des Schweines Nr. 252 (2) und einer Kontrolle (1) wurden mit *Eco*RI gespalten, nach einer 0,8 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit einem *Xba*I/*Bam*HI-Promotorfragment aus hMTII_AMx hybridisiert.

Bei zwei weiteren Tieren konnte die Integration Mx homologer Sequenzen nachgewiesen werden. Durch Hybridisierung der DNA des Schweines Nr. 252 mit einem 1,4 kb *Xba*I/*Bam*HI-Promotorfragment aus hMTII_AMx in

einer *EcoRI*-Spaltung erhält man ein Signal bei > 6,5 kb, das nicht in der Kontrolle auftritt (Abb. 40). Bei der vollständigen Integration einer einzelnen Kopie oder aber auch mehrerer "head to tail" verketteter Konstrukte würde man eigentlich ein Signal im hochmolekularen Bereich erwarten (vgl. dazu Abb. 37).

Zwei im hochmolekularen Bereich nachweisbare Banden, die auch in der Kontrolle erscheinen, sind Kreuzhybridisierungen des β -Globingens des Schweines mit dem β -Globinanteil der Probe. Die Spaltungen mit *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I, *Pst*I, *Pvu*II und *Taq*I (Abb. 41), bei denen mit dem 1,9 kb *Bam*HI/*Hind*III-Fragment hybridisiert wurde, zeigen ein völlig unerwartetes Restriktionsmuster.

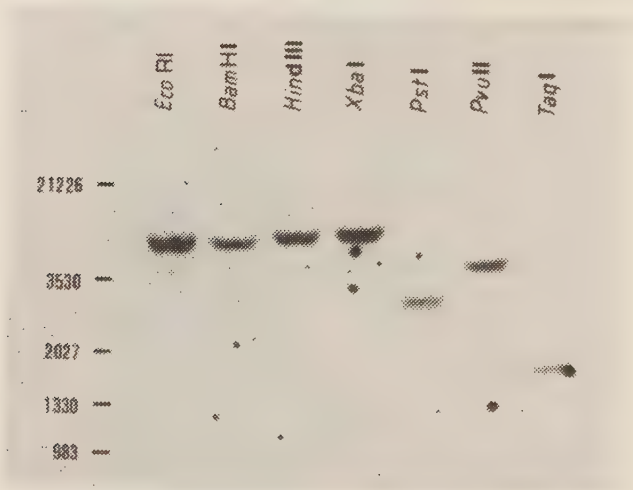


Abb. 41 : Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 252

Jeweils 30 μ g DNA des Schweines Nr. 252 wurden mit den angegebenen Restriktions-
enzymen gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter
übertragen und mit $Mx_{1,9}$ hybridisiert.

Expositionsdauer: 2 Tage

Bei diesem Tier sowie dem Fetus Nr. 682-1 (Abb. 42), der ebenfalls ein nicht erklärbares Bandenmuster aufweist, müssen vor der Integration der Fremd-DNA umfangreiche Veränderungen am Konstrukt stattgefunden haben. Die genaue Herkunft und Entstehung dieser Veränderungen kann nicht mehr rekonstruiert werden.

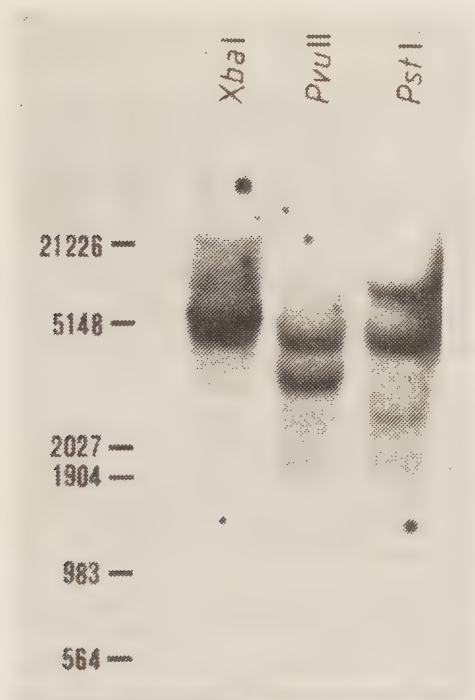


Abb. 42 : Southern Blot-Analyse des Schweines Nr. 682-1

Jeweils 30 µg DNA des Schweines Nr. 682-1 wurden mit den angegebenen Restriktions-enzymen gespalten, nach einer 1,0 %igen Agarose-Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit $Mx_{1,9}$ hybridisiert.

Expositionszeit: 24 Stunden

Durch Dot Blot-Analyse (Abb. 43) wurde bei allen 4 Schweinen die Kopienzahl bzw. Mx-Äquivalente/Zelle ermittelt (Tab. 6, vgl. dazu Anmerkungen in Kap. 5.4.3.1).

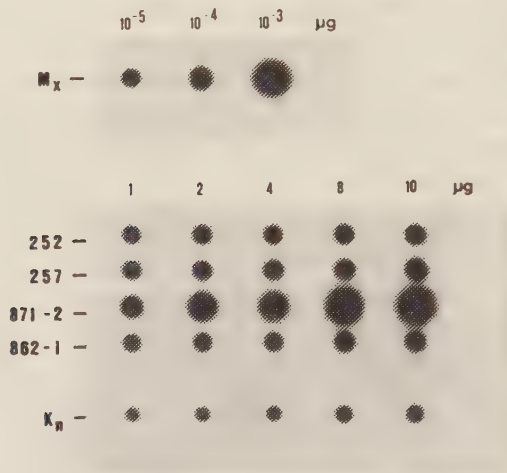


Abb. 43 : Dot Blot-Analyse der Schweine Nr. 252, 257, 871-2 und 682-1 zur Bestimmung der Anzahl der Kopien/Zelle
Jeweils 1, 2, 4, 8 und 10 µg DNA der Schweine Nr. 252, 257, 871-2, 682-1 und einer Kontrolle wurden mit 10⁻⁵, 10⁻⁴ und 10⁻³ µg hMTII_AMx (Mx) in 10 µg Lachssperma-DNA mit einer Bio Rad Bio-Dot™ Apparatur auf einen Nitrozellulosefilter aufgetragen und mit Mx_{1.9} hybridisiert. K_n: Negativ-Kontrolle
Expositionsdauer: 16 Stunden.
Nach erfolgreicher Exposition wurde der Filter mit einem Scanner (Berthold) gemessen.

Tier Nr.	252	257	871-2	682-1
Kopien/Zelle	4	9	84	1

Tab. 6 : Integrierte Kopien/Zelle oder Mx-Äquivalente/Zelle bei den Schweinen Nr. 252, 257, 871-2 und 682-1

Aus den Meßwerten der Dot Blot-Analyse wurde die Zahl der ins Genom integrierten Kopien/Zelle, unter Zugrundelegung einer haploiden Genomgröße von 3×10^6 kb, errechnet.

7.1

GRF und seine Bedeutung im Somatotropinstoffwechseltransgener Schweine

Die Aufklärung der Aminosäure- und DNA-Sequenz des menschlichen Wachstumshormons (hGH) und seine Expression in *E. coli* liegt inzwischen einige Jahre zurück (Roskam and Rougeon, 1979; Goeddel *et al.*, 1979; Martial *et al.*, 1979). Seither konnte von Barsh *et al.* (1983) der Genlocus des hGHs und anderer sehr nahe verwandter Proteohormone (HCS, Prolactin) identifiziert werden. Der Vergleich des menschlichen Wachstumshormons mit dem anderer Vertebraten, sowohl auf Protein- als auch DNA-Ebene, zeigt erstaunlich hohe Übereinstimmungen. Innerhalb der Säugetiere sind nur geringe Unterschiede festzustellen. So unterscheidet sich z. B. das hGH vom Wachstumshormon der Ratte (rGH) nur in 34,4 % der Aminosäuren (Seeburg *et al.*, 1977). Das rGH unterscheidet sich vom Wachstumshormon des Rindes (bGH) in 12,1 % und von dem des Pferdes (eGH) in 6,3 % (Seeburg *et al.*, 1977). Das bGH weist eine nahezu 90 %ige Homologie zum Wachstumshormon des Schweines (pGH) auf (Seeburg *et al.*, 1983). Trotz des hohen Grades an Übereinstimmung der GHs der Vertebraten ist ihre biologische Wirksamkeit artgebunden (Seeburg *et al.*, 1983). Während die biologische Wirksamkeit des rGHs und hGHs in transgenen Mäusen gezeigt werden konnte (Palmiter *et al.*, 1982 a; Palmiter *et al.*, 1983; Brem *et al.*, 1985), hat das rGH im Menschen keine wachstumsfördernde Wirkung (Roskam and Rougeon, 1979). Auch konnte keine Wachstumsstimulierung beim Schwein durch hGH erreicht werden (Hammer *et al.*, 1985 a).

Eine andere Möglichkeit der Regulation des Somatotropinstoffwechsels besteht in der neurohormonellen Beeinflussung der Bildung und Ausschüttung des Wachstumshormons. Unter physiologischen Bedingungen wird die Synthese und Freisetzung des Somatotrocinins (GRF, GRH, GHRH, GHRF) und Somatostatin (GHIF, GHIH) über neurale Reize im Hypothalamus (*Nucleus*

supraopticus) geregelt. Ihre Freisetzung bewirkt entweder die Hemmung oder Bildung und Ausschüttung des Somatotropins.

Da die Freisetzung dieser regulierenden Hormone über die Blutbahn erfolgt, läßt sich der Somatotropinstoffwechsel auch durch intravenöse Applikation des GRF positiv beeinflussen.

Die Homologie der Aminosäuresequenz des menschlichen GRF mit der des Schweines beträgt 93,2 %. Sie unterscheiden sich nur in 3 Aminosäuren (AS 34, Ser→Arg; AS 38, Arg→Gln; AS 42, Ala→Val) (Coudé *et al.*, 1984). Durch intravenöse Injektion des menschlichen GRF konnte bei Tieren die Ausschüttung des endogenen Wachstumshormons nachgewiesen werden. Die Auswirkungen des hGRF auf die Produktion und Ausschüttung des endogenen Wachstumshormons und das Wachstum von transgenen Mäusen konnte von Hammer *et al.* (1985 b) gezeigt werden.

Mit der Klonierung eines mikroinjizierbaren Genkonstrukts, bestehend aus dem Metallothionein-I Promotor der Maus und dem menschlichen GRF als Strukturgen, soll die Wirkungsweise des menschlichen Wachstumshormon-Releasing Factors in den damit erzeugten transgenen Schweinen erforscht werden.

7.2 MThGH und hMTII_AMx in transgenen Tieren

Die Erzeugung transgener Mäuse mit Genkonstrukten, bestehend aus dem mMT-I Promotor und Wachstumshormongenen der Ratte oder des Menschen, und deren Expression konnte gezeigt werden (Palmiter *et al.*, 1982 a; Palmiter *et al.*, 1983; Brem *et al.*, 1985). 1985 gelang es auch transgene Kaninchen (Hammer *et al.*, 1985 a; Brem *et al.*, 1985), Schafe (Hammer *et al.*, 1985 a) und Schweine (Hammer *et al.*, 1985 a; Brem *et al.*, 1985) durch Mikroinjektion eines MThGH-Fusionsgens zu erstellen.

Die Verwendung des Genkonstrukts MThGH zur Erstellung transgener Tiere hat verschiedene Vorteile. In Spezies, bei denen hGH eine wachstums-stimulierende Wirkung hat (z. B. Maus), läßt sich durch Analyse der Gewichtsentwicklung die erfolgreiche Integration und Expression nachweisen. Untersuchungen zur Expression werden durch Messungen des hGH-Spiegels

im Serum mittels RIA unterstützt. Der mMT-I Promotor erlaubt eine Verstärkung der Expression durch Zugabe von ZnSO_4 im Trinkwasser. Der Nachweis der Integration im Southern Blot ist problemlos zu führen, da unter stringenten Bedingungen keine Kreuzhybridisierung mit heterologem GH auftritt.

Anders ist die Situation bei hMTII_AMx. Erfahrungen mit transgenen Tieren liegen nicht vor. Das Vorhandensein Mx ähnlicher DNA-Abschnitte in anderen Säugetieren (Staeheli *et al.*, 1985; Staeheli *et al.*, 1986 b) kompliziert den Nachweis des mikroinjizierten Konstrukts, da Kreuzhybridisierungen mit heterologen DNA-Sequenzen auch unter stringenten Bedingungen auftreten. Die Wirksamkeit des Mx-Proteins in Mäusen und in der Zellkultur wurde beschrieben (Staeheli *et al.*, 1986 b). Inwieweit transgene Schweine durch die Expression des Mx-Proteins Resistenz gegenüber Influenzainfektionen ausbilden, muß in folgenden Experimenten untersucht werden.

7.3

Mikroinjizierte Genkonstrukte und ihre Integration ins

Wirtsgenom

Tiere, die sich aus mikroinjizierten Zygoten entwickelten, und deren Nachkommen wurden auf Integration der Fremd-DNA untersucht. Durch differenzielle Restriktions- und Southernanalyse wurde ein zum Teil komplexes Integrationsschema ermittelt, das sich nicht mehr aus dem ursprünglichen Restriktionsmuster der Konstrukte erklären läßt. Es muß deshalb versucht werden, Modelle zu erstellen, die die Veränderungen der Genkonstrukte in Form von Mutationen oder durch Verkettung verständlich machen.

Untersuchungen zur Expression durch Isolierung zytoplasmatischer RNA aus Geweben und deren Analyse im Northern Blot konnten bei den meisten Tieren nicht durchgeführt werden.

Die meisten Mäuse und Kaninchen, die aus Mikroinjektionen mit MThGH entstanden, verendeten frühzeitig (prä-, postnatal) oder bevor der Integrationsnachweis geführt werden konnte.

Von den aus MThGH-Mikroinjektionen entstandenen Schweinen sind zwei Tiere noch am Leben, während die anderen entweder Totgeburten waren oder im Laufe der ersten Lebenswochen von ihrer Mutter erdrückt wurden. Diese

Tiere waren teils schon so stark autolytisch, daß keine intakte RNA isoliert werden konnte.

Bei Trägern des hMTII_AMx-Gens sind ebenfalls zwei Tiere am Leben, die beiden anderen waren Feten.

Die Gefährdung der lebenden Tiere durch einen operativen Eingriff zur Gewinnung frischen Biopsiematerials (Leber, Niere) sollte vermieden werden. Erst nach einer erfolgreichen Anpaarung und dem Integrationsnachweis bei den Nachkommen können umfangreichere Untersuchungen zur Expression durchgeführt werden.

Um trotzdem eine Aussage über das Maß der Expression machen zu können, wurden bei Trägern des MThGH Blutproben gewonnen und im RIA auf Anwesenheit des menschlichen Wachstumshormons untersucht. Bei Mäusen wurden zudem laufende Gewichtskontrollen durchgeführt.

Die intrazellulären Vorgänge, die zur Integration von Fremd-DNA manipulierter Zygoten oder Zellen durch Mikroinjektion oder Transfektion führen, sind im Detail nicht geklärt.

Meistens entstehen Tandemstrukturen in einer sogenannten "head to tail" Verkettung der mikroinjizierten DNA-Fragmente, bevor eine Integration ins Genom stattfindet. Robins *et al.* (1981) konnte in mit verschiedenen Konstrukten des menschlichen Wachstumshormon-Gens transfizierten Zellen 5-100 Kopien nachweisen und ihre Lokalisation an einer einzigen chromosomalen Stelle durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente nachweisen. Von Zelle zu Zelle variierten jedoch die Integrationsorte. Daraus folgte er, daß es vor der Integration der Fremd-DNA zur Ausbildung großer konkatemerer Strukturen kommt, die dann oft in Bereiche chromosomaler Umlagerungen integrieren. Auch Perucho *et al.* (1980) folgern aus ihren Experimenten, daß zunächst umfassende konkatemere Strukturen durch intermolekulare Ligation gebildet werden und dann erst die Integration ins Genom folgt. Der Vorgang der Ligation läuft wesentlich rascher ab als die chromosomale Bindung oder Eingliederung. Er bezeichnet die Formation aus exogener, mikroinjizierter und chromosomaler Wirts-DNA als "Pekelasom".

Um einen besseren Einblick in die Vorgänge direkt vor der Integration mikroinjizierter DNA zu erhalten, isolierten Brinster *et al.* (1985) DNA aus manipulierten Zygoten etwa 24 Stunden nach Injektion. Bedingt durch die Fülle an enzymatischer Aktivität in Maus-Zygoten, konnte er verschiedenste Modifikationen der DNA nachweisen. Diese reichten von einfachen Rekombinationen untereinander über Rezirkularisierungen linearer DNA-Fragmente bis zu Veränderungen der 5'- und 3'-Enden der mikroinjizierten DNA. Diese

Ereignisse werden u. a. durch die hohe lokale Konzentration der Fremd-DNA begünstigt.

Bei iontophoretischer Mikroinjektion konnten dagegen solche Phänomene nicht beobachtet werden (Lo, 1983). Auch wurde mit dieser Methode eine Integration vieler einzelner Kopien an verschiedenen Orten erzielt. Dies ist auf völlig unabhängige Integrationsereignisse zurückzuführen und sicherlich eine Besonderheit dieser Technik.

Eine häufig beobachtete Erscheinung ist, daß intranukleär rezirkularisierte DNA-Fragmente unabhängig von der Replikation des Wirtsgenoms eine eigenständige replikative Vermehrung durchlaufen und es somit zu einer Anreicherung modifizierter DNA vor ihrer Integration ins Genom kommt (Palmiter *et al.*, 1982 a).

7.3.1 Integrationsmodelle bei transgenen Mäusen

Durch Mikroinjektionen des Genkonstrukts MThGH konnten 8 transgene Mäuse erzeugt werden. 7 Mäuse hatten eine einzelne Kopie des mikroinjizierten Konstrukts in ihr Genom integriert. Dabei gingen die 5'- und 3'-*EcoRI*-Schnittstellen des Konstrukts verloren. Die Spaltungen mit diesem Restriktionsenzym führen deshalb zu einem Signal im hochmolekularen Bereich, da Teile chromosomaler DNA dem Konstrukt anhaften. Spaltet man jedoch mit einer Restriktionsendonuklease, die zwei Schnittstellen im Konstrukt besitzt, wie z. B. *PvuII*, erhält man bei vollständiger Integration des Fremd-Gens ein Fragment in dem molekularen Bereich, den man aus der Spaltung des Konstrukts erwarten würde.

Bei den Mäusen Nr. 511, 811, 911, 1211 und 1811 war nur ein sehr schwaches Signal zu sehen. Nr. 511 wurde auf Mosaizismus untersucht. Oft kommt es erst in einem späteren Stadium der Embryogenese zur Integration, mit der Folge daß nur ein Teil der Zellen Träger des mikroinjizierten Gens wird. Die Bildung von Mosaiken ist ein relativ häufiges Ereignis, das von Brinster *et al.* (1985) in 10-20 % aller Fälle beobachtet wird. Die Erzeugung von Mosaiken ist vor allem bei der Verwendung von retroviralen Vektoren bekannt (Perucho *et al.*, 1980; Jaenisch *et al.*, 1981; van der Putten *et al.*, 1985; Palmiter and Brinster, 1985). Mosaik eignen sich nicht zur Erstellung transgener Nachkommen. Durch die späte Integration der Fremd-DNA ist natürlich auch nur ein Teil der Keimzellen Träger des fremden genetischen Materials. Deshalb wird das mikroinjizierte Gen nur selten vererbt.

Bei den Nachkommen des Tieres Nr. 211 lassen sich anhand der Restriktionsfragmente in der Southern-Analyse drei verschiedene Integrationsmuster feststellen. Sie sind nur dadurch erklärbar, daß Nr. 211 das Genkonstrukt an mindestens zwei Loci integrierte und diese unabhängig voneinander vererbt werden. Daß auch aus Mikroinjektionen in Vorkerne wie bei der Iontophorese (Lo, 1983) eine Integration an verschiedenen Stellen des Genoms stattfinden kann, wurde schon von Brinster *et al.* (1983), Storb *et al.* (1984) und Swift *et al.* (1984) berichtet.

Folgende Modelle lassen sich aus den Ergebnissen der Southern-Analyse entwickeln.

1) Den Tieren Nr. 211-I-3 und 211-I-7 wurden drei Kopien einer linearen Integrationsstelle vererbt, bei der die *EcoRI*-Randschnittstellen erhalten sind (Abb. 44, E). Die Hydrolyse mit diesem Restriktionsenzym führt zu einer starken Bande bei 4,0 kb, der Länge des MThGH-Konstrukts. Im hoch-molekularen Bereich sind keine Signale sichtbar.

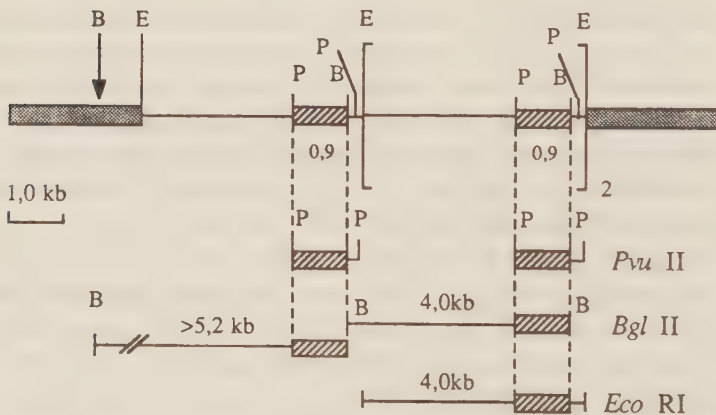


Abb. 44 : Integrationsmodell bei den Mäusen Nr. 211-I-3 und 211-I-7
 B: *BglII*; E: *EcoRI*; P: *PvuII*
 Schraffierte Boxen: hGH₉₀₀; Graue Boxen: Chromosomale DNA.

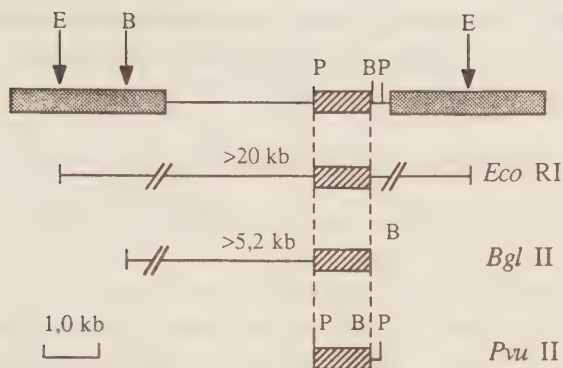


Abb. 45 : Integrationsmodell bei den Mäusen Nr. 211-I-5, 211-II-7 und 211-III-1

B: *Bgl*II; E: *Eco*RI; P: *Pvu*II

Schraffierte Boxen: hGH₉₀₀; Graue Boxen: Chromosomale DNA.

Durch Spaltung mit *Pvu*II (Abb. 44, P) ist das interne 1,05 kb-Fragment aus hGH darstellbar. Die *Bgl*II-Hydrolyse (Abb. 44, B) liefert eine Bande bei >5,2 kb. Sie stammt aus dem 5'-Randbereich der Integrationsstelle. Dem Fragment haften ca. 2 kb genomische DNA an, die bis zur nächsten *Bgl*II-Schnittstelle (Abb. 44, B↓) stromaufwärts im Genom reichen. Das zweite Signal bei 4,0 kb entsteht aus dem 3'-Ende des mittleren integrierten Konstrukts mit Anteilen des nachfolgenden und entspricht der Länge des gesamten MThGH.

2) Den Tieren Nr. 211-I-5, 211-II-7 und 211-III-1 wurde eine Kopie des MThGH-Genkonstrukts vererbt. Die *Eco*RI-Schnittstellen des Konstrukts (Abb. 45) gingen durch die Verknüpfung mit der Wirts-DNA verloren. Bei der Spaltung mit diesem Restriktionsenzym (Abb. 45, E↓) wird ein Fragment gebildet, das am 5'- und 3'-Ende Teile genomischer DNA trägt und deshalb bei >20 kb läuft. Die internen *Pvu*II-Schnittstellen (Abb. 45, P) sind erhalten. Durch Hydrolyse mit *Bgl*II entsteht ein Signal bei >5,2 kb. Es besteht aus 3,16 kb des MThGH-Konstrukts und 5'-Anteilen genomischer DNA bis zu der nächsten genomischen *Bgl*II-Schnittstelle stromaufwärts (Abb. 45, B↓).

3) Nr. 211-I-4, 211-II-3 und 211-II-4 bekamen beide Integrationsstellen vererbt. Nr. 211-II-3 und 211-II-4 haben insgesamt vier Kopien des Konstrukts in ihr Genom integriert und stellen restriktionsanalytisch eine Addition aus 1) und 2) dar. Die Spaltungsmuster dieser Tiere entsprechen denen von Nr. 211.

7.3.2 Integrationsmodelle bei transgenen Kaninchen

Über die Erzeugung transgener Kaninchen wurde von Hammer *et al.* (1985 a) und Brem *et al.* (1985) berichtet.

Hammer *et al.* (1985 a) mikroinjizierte ein lineares 2,6 kb-Konstrukt mit dem menschlichen Wachstumshormogen und konnte 28 transgene Kaninchen durch Southern-Analyse identifizieren. Trotz einer teils sehr hohen Anzahl ins Wirtsgenom integrierter Kopien des Konstrukts (bis zu 88) konnte nur bei vier Tieren Transkription und bei einem Translation nachgewiesen werden. Die Restriktionsmuster im Southern Blot lassen erkennen, daß wie bei Mäusen Tandemstrukturen in linearer Verkettung, aber auch Doppelbildungen mit ein-ander entgegengesetzten Fragmenten entstehen. Die Situation nach der Mikroinjektion in Vorkerne befruchteter Kanincheneizellen dürfte mit der der Maus vergleichbar sein.

Aus Mikroinjektionen des 4,0 kb MThGH-Genkonstrukts konnten insgesamt 9 transgene Kaninchen mit sehr unterschiedlichen Integrationsmustern erstellt werden. Die ins Genom integrierte Kopienzahl pro Zelle schwankt bei den untersuchten Kaninchen zwischen 0,1 und 69.

Bei der Spaltung der DNA der Tiere Nr. 26 und 38 mit *EcoRI* entsteht ein sehr schwaches Signal bei 4,0 kb. Dies entspricht der Länge eines Konstrukts. Die Tiere Nr. 79-81 zeigen dagegen eine Bande im hochmolekularen Bereich. Mit *PvuII* läßt sich das interne 1,05 kb-Fragment darstellen. Bei den Tieren Nr. 26, 38 und 79-81 wurde das vollständige MThGH-Genkonstrukt integriert. Die Integration erfolgte jedoch nicht im einzelligen Stadium, sondern zu einem späteren Zeitpunkt der Embryogenese. Deswegen haben diese Tiere rein rechnerisch weniger als eine Kopie/Zelle in ihr Genom aufgenommen. Es handelt sich um Mosaiken.

Diese Ergebnisse werden zusätzlich dadurch bestätigt, daß bei sämtlichen Nachkommen von Nr. 81 keine Integration des MThGH nachgewiesen werden konnte.

Tier Nr. 18/5 weist ein einfaches lineares Integrationsmuster mit Verkettung von 39 Kopien/Zelle auf. Restriktionsenzyme, die einmal im Konstrukt schneiden (*KpnI*, *BglII*), liefern eine starke Bande bei 4,0 kb. Die beiden

schwächeren Signale im hochmolekularen Bereich, die auch bei Spaltung mit *EcoRI* und *SacI* zu sehen sind, entstehen aus dem Randbereich mit Anteilen chromosomaler DNA. *SacI* und *PvuII* liefern die erwarteten internen Fragmentbanden bei 0,8 kb und 1,05 kb.

Die Tiere Nr. 062/7 und 062/9 haben sehr intensive Banden, die sich aus der hohen Kopienzahl des ins Genom integrierten Konstrukts erklären. Aus den Restriktionsmustern ist zu erkennen, daß neben einer linearen Verkettung des MThGH auch dimere "head to head" bzw. "tail to tail" Reihen entstanden sind (Abb. 46), wie das starke Signal bei 6,3 kb bei der Hydrolyse mit *BglII* (Abb. 46, B) bei diesen Tieren zeigt. Die Entstehung dieses Fragments ist dadurch erklärbar, daß zwei Konstrukte in gegeneinander gerichteter Orientierung integrierten. Die zusätzlichen Banden, die nicht aus dem Spaltungsmuster des pXGH-1 zu deuten sind (bei *EcoRI*, >4,4 kb; *BglII*, >4,3 kb; *PvuII*, 7-8 kb), stellen Fragmente aus den Randbereichen der Integration dar. Ihnen haften Teile genomischer DNA an.

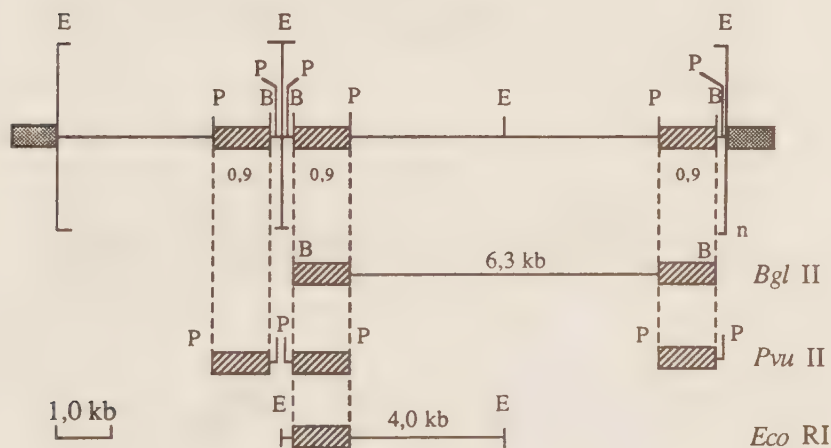


Abb. 46 : Integrationsmodell bei den Kaninchen Nr. 062/7 und 062/9

B: *BglII*; E: *EcoRI*; P: *PvuII*; []_n: n-Kopien

Schraffierte Boxen: hGH₉₀₀; Graue Boxen: Chromosomale DNA

1985 wurden von Hammer *et al.* (1985 a) und Brem *et al.* (1985) über die Erzeugung transgener Schweine berichtet.

Hammer *et al.* (1985 a) mikroinjizierte das gleiche Genkonstrukt, das er auch schon für Mikroinjektionen bei Kaninchen verwandt hatte, und konnte 20 transgene Schweine nachweisen. Brem *et al.* (1985) konnten durch Southern Blot- und Dot Blot-Analyse die erfolgreiche Integration des MThGH-Genkonstrukts bei einem Schwein nachweisen.

Inzwischen sind 9 weitere Schweine mit MThGH-Integration ermittelt worden. Bei diesen Tieren wurden zwischen 2 und 14 Kopien des Genkonstrukts integriert, die eine einfache "head to tail" Verkettung aufweisen. Alle Restriktionsmuster zeigen die vollständige Integration des Konstrukts ohne Veränderungen der Randbereiche.

Die Integration des hMTII_AMx wurde bei 4 Schweinen nachgewiesen. Die Restriktionsmuster der beiden transgenen Schweine Nr. 252 und 682-1 lassen keine Deutung der Herkunft der Banden zu. In beiden Fällen muß es zu schwerwiegenden Veränderungen am Konstrukt gekommen sein, bevor die Integration ins Genom erfolgte. Eine funktionelle Expression bei Nr. 252 ist kaum zu erwarten.

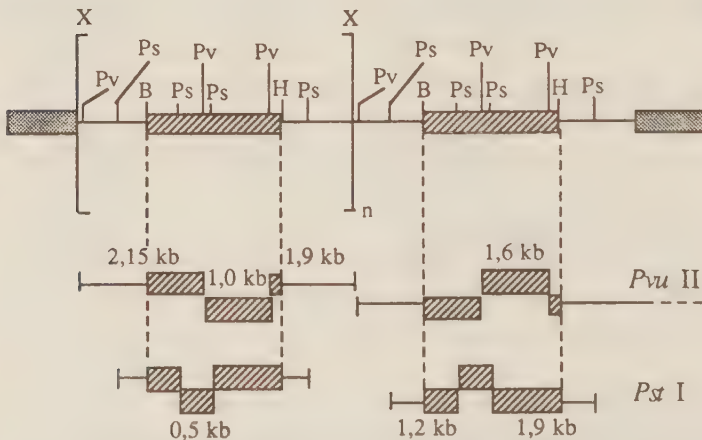


Abb. 47 : Integrationsmodell bei dem Schwein Nr. 871-2

X: XbaI; H: HindIII; B: BamHI; Ps: PstI;

Pv: PvuII; []_n: n-Kopien

Schraffierte Boxen: Mx_{1,9}; Graue Boxen: Chromosomale DNA

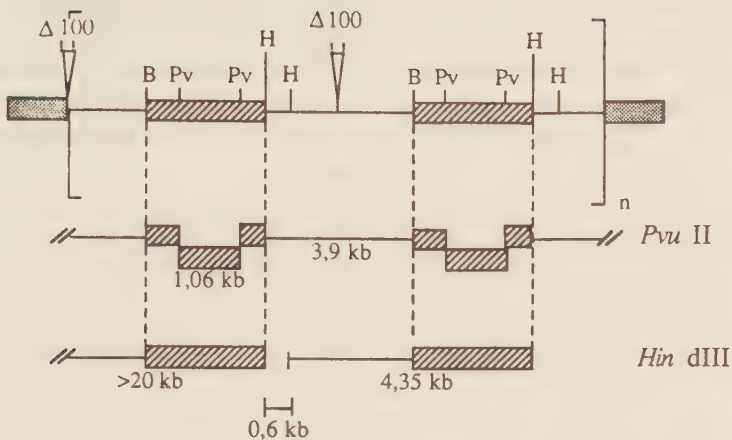


Abb. 48 : Integrationsmodell bei dem Schwein Nr. 257

B: *Bam*HI; H: *Hind*III; Pv: *Pvu*II; []_n: n-Kopien;

Δ100: 5'-Deletion von ungefähr 100 bp

Schraffierte Boxen: Mx_{1,9}; Graue Boxen: Chromosomale DNA

Der Fetus Nr. 871-2 zeigt eine "head to tail" Verkettung der 84 aufgenommenen Kopien (Abb. 47). Durch Spaltung mit *Pvu*II (Abb. 47, Pv) entstehen 3 Banden bei 1,0 kb, 1,9 kb und 2,15 kb. Diese Fragmente sind aus dem Spaltungsmuster des hMTII_AMx zu erwarten. Auch die Hydrolyse mit *Pst*I (Abb. 47, Ps) liefert alle aus dem Konstrukt zu erwartenden Banden.

Bei Nr. 257 (Abb. 48) wurden neben nahezu vollständig integrierten Kopien auch Bruchstücke des Konstrukts, die keine Funktionalität mehr besitzen, integriert.

In den Southern-Analysen sind zusätzlich zu den aus der Restriktionskarte zu erwartenden Banden Signale sichtbar, die von Fragmenten des hMTII_AMx stammen. Nach der Mikroinjektion muß es bei einer Kopie zunächst zur Deletion von ungefähr 100-150 bp am 5'-Ende des Konstrukts (Abb. 48, Δ100) über die *Pvu*II-Schnittstelle bei 0,08 kb hinaus gekommen sein. Alle anderen *Pvu*II-Schnittstellen im Konstrukt sind erhalten. Das 3,9 kb-Fragment wird durch den 3'-Anteil eines Konstrukts und die 5'-Region des folgenden gebildet. Die Erkennungssequenzen von *Pst*I, *Hind*III und *Bam*HI innerhalb des hMTII_A-Promotors, Mx-Gens und der 3'-Region aus dem β-Globingen

der Maus sind erhalten und nachweisbar. Durch die Deletion läuft das eigentlich bei 4,5 kb zu erwartende *Hind*III-Fragment bei 4,35 kb.

Das deletierte Konstrukt wurde anschließend mit Bruchstücken anderer Kopien replikativ angereichert und dann ins Genom integriert. Ob die Bruchstücke und das hMTII_AMx direkt miteinander integriert sind oder Anteile chromosomaler DNA dazwischen liegen, war nicht zu klären.

Der Verlust der 100-150 bp, die aus der 5'-untranslatierten Region des β -Globingens des Kaninchens stammen, hat keinen Einfluß auf die Expression. Der hMTII_A-Promotor ist von der Deletion nicht betroffen. Die TATA-Box, die Schwermetall sensitiven Elemente (MRE-1, MRE-2) sowie andere wesentliche Expressionssignale liegen über 1,2 kb stromabwärts (Varshney *et al.*, 1986).

Auf Grund der Intensität der Banden im Southern Blot sind mindestens 50 % der im Dot Blot errechneten Kopien/Zelle in funktioneller Weise integriert worden. Von daher dürfte eine Expression zu erwarten sein. Entsprechende Experimente müssen dies natürlich noch bestätigen.

Die Technik des Gentransfers durch Mikroinjektion *in vitro* rekombinierter Gene oder Genkonstrukte in die Vorkerne befruchteter Eizellen bietet die Möglichkeit qualitative und quantitative Merkmale artübergreifend zu etablieren. Tierzüchterisch wertvolle genotypische Eigenschaften verschiedener Arten lassen sich konservieren und jederzeit in eine Population einbringen.

Durch die Produktion transgener Mäuse ist man in der Lage, die Wirkungsweise integrierter Fremd-DNA zu untersuchen. Auf Grund des kurzen Generationsintervalls dieser Tierart können anhand von Nachkommen transgener Tiere rasch Daten über den Integrationsort, die Expression, Vererbbarkeit und physiologischen Folgen der Fremdgenexpression erhalten werden.

Die Übertragbarkeit der Technik des Gentransfers auf andere Tierarten konnte in vorliegender Arbeit nachgewiesen werden. Mit dem Einsatz geeigneter Genkonstrukte und deren dauerhafter Integration in die Keimbahn transgener Nutztiere wird es möglich sein, konventionelle Methoden der Tierproduktion und Tierzucht zu ergänzen oder zu ersetzen.

Die Verwendung von Genen aus dem Wachstumshormonregelkreis (z. B. GRF) und ihre Expression in transgenen Nutztieren kann zu einem verbesserten Leistungsstoffwechsel dieser Tiere führen und würde den Gebrauch von Anabolika überflüssig machen.

Durch Mikroinjektion von Krankheitsresistenzgenen (z. B. Mx-Gen) können Tiere erzeugt werden, die gegenüber bestimmten Krankheiten resistent sind und so kostenintensive Impfungen entbehrlich machen.

Rekombinante Gene oder Genkonstrukte, die einen Einfluß auf die Qualität bestimmter tierischer Produkte (z. B. Milch) haben, wurden bisher noch nicht mikroinjiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonierung eines mikroinjizierbaren Genkonstrukts zur Erstellung transgener Tiere durchgeführt und beschrieben.

Dieses Konstrukt besteht aus dem Metallothionein-I Promotor der Maus (mMT-I) als regulatorischem Element und wurde aus dem Plasmid HamerMT als *PvuII/BglII*-Fragment isoliert. Mittels einer *BglII/EcoRI*-Fusion konnte der Promotor mit den kodierenden Bereichen des Wachstumshormon-Releasing Factor-Gens des Menschen (hGRF) aus dem Expressionsvektor LZPGRF 1/3 (Leu 27) ligiert werden.

Die 3'-Region wird durch ein *HaeIII/BamHI*-Fragment aus dem Plasmid pSV2-cat^s gebildet, das neben 0,3 kb des CAT-Gens einen Teil des kleinen t-Antigens von SV40 trägt, welcher die Donor- und Akzeptorstellen des Introns des kleinen t-Antigens sowie die 3'-Expressionssignale 5'-AATAAA-3' und 5'-TGTGGTTT-3' beinhaltet.

Das so gebildete Konstrukt MTGRF-1 wurde in den Polylinker von pUC18 kloniert und kann als 3,07 kb *EcoRI/BamHI*-Fragment aus dem Plasmid pMTGRF-1 (5,7 kb) isoliert werden. Durch Transfektion von BHK-Zellen mit pMTGRF-1 konnte Transkription *in vitro* gezeigt werden.

Durch die Mikroinjektion dieses Genkonstrukts ist man nun in der Lage, durch gezielte Expression die physiologischen Folgen einer vermehrten Wachstumshormon-Releasing Factor Bildung auf den Somatotropinstoffwechsel transgener Tiere zu untersuchen.

Weiterhin wurden Tiere, die aus Mikroinjektionen anderer Genkonstrukte entstanden waren, auf Integration der Fremd-DNA untersucht. Hierzu wurden Verfahren gefunden und verbessert, die einen raschen und sicheren Nachweis der mikroinjizierten DNA ermöglichen.

Aus Mikroinjektionen des Genkonstrukts MThGH, eines Fusionsgens, bestehend aus dem Metallothionein-I Promotor der Maus und dem menschlichen Wachstumshormon-Gen (hGH), konnten transgene Mäuse, Kaninchen und Schweine nachgewiesen werden. MThGH (4,0 kb) läßt sich als *EcoRI/EcoRI*-DNA Fragment aus dem Plasmid pXGH-1 (9,31 kb) isolieren.

Durch Southern Blot- und Dot Blot-Analysen konnten 8 Mäuse, die aus direkten Mikroinjektionen erstellt worden waren, als Träger des Genkonstrukts identifiziert werden. Zusätzlich wurden Nachkommen einer transgenen Maus untersucht und bei 8 Tieren die Vererblichkeit und Keimbahnintegration der Fremd-DNA nachgewiesen.

Insgesamt 9 transgene Kaninchen mit einer sehr unterschiedlichen Anzahl ins Genom integrierter Genkopien konnten ausgemacht werden. Drei dieser Kaninchen waren Mosaik. Nachkommen einer Mosaik wurden ebenfalls untersucht. Bei diesen Tieren war jedoch keine Integration nachweisbar.

Transgene Schweine wurden sowohl mit MThGH, als auch mit einem Genkonstrukt hMTII_AMx erstellt und untersucht.

Aus Mikroinjektionen mit MThGH konnten 10 transgene Schweine identifiziert werden, die zwischen 2 und 14 Kopien des Konstrukts in einer "head to tail" Verkettung in ihr Genom integriert hatten.

hMTII_AMx ist ein 5,07 kb *XbaI/XbaI*-Genkonstrukt, welches aus dem menschlichen Metallothionein-II_A Promotor als regulatorischem Element und dem Influenzaresistenz-Gen Mx der Maus besteht. Das Mx-Gen kodiert für ein Protein, das die Replikation bestimmter Influenza A-Viren hemmt und Mäuse, die Träger des funktionellen Allels Mx⁺ sind, resistent gegenüber einer entsprechenden Infektion macht.

Bei 4 Schweinen wurde die Integration des hMTII_AMx-Genkonstrukts bzw. hMTII_AMx homologer Sequenzen nachgewiesen. Ein Fetus zeigte dabei eine einfache "head to tail" Verkettung von 84 Kopien, während es bei einem lebenden Schwein zu Veränderungen am Konstrukt vor der Integration kam. Davon wurden jedoch keine für die Expression wesentlichen Sequenzen betroffen.

Falls Mx artübergreifend die gleiche Wirkung in transgenen Nutztieren wie in der Maus und Kulturzellen hätte, wäre es möglich, durch Mikroinjektion, influenzaresistente Populationen aufzubauen.

Anhand der Southern Blot- und Dot Blot-Analysen konnten bei allen untersuchten und transgenen Tieren Integrationsmodelle der mikroinjizierten Fremd-DNA entwickelt werden, die die Art der Integration in Form von "head to tail" Konkatemeren, Dimerisation oder Mutation erklären.

Summary

Cloning of gene constructs for microinjection and their detection in transgenic animals

- A contribution to the use of transgenes in livestock production -

For the production of transgenic animals by microinjection there has been cloned a gene construct, consisting of the mouse metallothionein-I promoter fused to the coding regions of the human growth hormone-releasing factor gene (hGRF).

The *PvuII/BglII*-promoter fragment has been isolated from the plasmid HamerMT and was fused in a *BglII/EcoRI*-site to the hGRF gene which is included in the vector LZPGRF 1/3 (Leu 27).

The 3'-untranslated region was obtained as a *HaeIII/BamHI*-fragment from the plasmid pSV2-cat^s, containing 0.3 kb downstream CAT-sequences, and a part of the small t-antigen of SV40, carrying the donor and acceptor sites of the intron of the small t-antigen, as well as the highly conserved consensus sequences 5'-AATAAA-3' and 5'-TGTGGTTT-3'.

This construct, designated as MTGRF-1, was cloned into the polylinker of pUC18, giving the plasmid pMTGRF-1 (5.7 kb). It can be isolated as a 3.07 kb *EcoRI/BamHI*-fragment.

By transfection of BHK-cells with pMTGRF-1, *in vitro*-transcription could be shown.

Production of transgenic animals by microinjection of this gene construct offers the opportunity of studying the physiological consequences of the regulated foreign gene expression on the growth hormone cascade.

Furthermore animals were analyzed that were generated from microinjected fertilized eggs with other different gene constructs.

Therefore several improved techniques for simple and rapid detection of transgenic DNA sequences had to be developed.

Integration of the MThGH-fusion gene construct, consisting of the mouse metallothionein-I promoter and the structural gene coding for the human growth hormone, could be shown in mice, rabbits, and pigs.

MThGH is a 4.0 kb *EcoRI/EcoRI*-DNA fragment, which can be isolated from the plasmid pXGH-1 (9.31 kb).

By Southern- and dot blot-analyses, 8 mice which were directly generated by microinjection could be identified. Additional 8 offspring of one transgenic mouse were analyzed, demonstrating transmission and germ line integration of the foreign gene.

Integration of quite different gene copynumbers/cell of the MThGH were detected in 9 transgenic rabbits. 3 of them had less than one copy/cell integrated and therefore presumed to be mosaics. This was confirmed by the results of Southern blot analysis from offspring of one of these rabbits, which had no detectable MThGH sequences.

Transgenic pigs were generated with MThGH, as well as with the gene construct hMTII_AMx, and were analyzed by Southern and dot blotting.

10 transgenic pigs could be identified, harboring 2 to 14 copies of MThGH per cell in a "head to tail" arrangement.

hMTII_AMx is a 5.07 kb *XbaI/XbaI* DNA-fragment which contains the human metallothionein-II_A promoter and the mouse influenza virus resistance gene Mx, coding for a protein that inhibits influenza virus replication in mice and transfected 3T3 cells.

By Southern blot- and dot blot-analyses 4 transgenic pigs were detected, showing integration of the hMTII_AMx gene construct or hMTII_AMx related sequences. One fetus had integrated about 84 copies/cell in a simple "head to tail" concatemer. Whereas a living pig, harboring 9 copies/cell, integrated a 5'-deleted fragment of the hMTII_AMx construct. This deletion occurred at the very 5'-end of the construct so that no effects on the expression are to be expected.

If the constitutive expression of the Mx function was the same in transgenic animals, it could be possible to generate transgenic livestock with an enhanced resistance to influenza viruses.

Out of the Southern- and dot blot-analyses, models of integration of the foreign genes have been developed for all transgenic animals analyzed, explaining the mode of integration by "head to tail" and "head to head" concatemerisation or mutation.

- Abramcauk, J., Vorbrodt, A., Solter, D. and Koprowski, H. (1978) : Infection of mouse preimplantation embryos with simian virus 40 and polyoma virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 999 - 1003
- Adams, T.E., Alpert, S. and Hanahan, D. (1987) : Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic β cells.
Nature **325**, 223 - 228
- Andersen, R.D., Birren, B.W., Taplitz, S.J. and Herschman, H.R. (1986) : Rat metallothionein-1 structural gene and three pseudogenes, one of which contains 5'-regulatory sequences.
Mol. Cell. Biol. **6**, 302 - 314
- Baranska, W., Sawicki, W. and Koprowski, H. (1971) : Infection of mammalian unfertilized and fertilized ova with oncogenic viruses.
Nature **230**, 591 - 592
- Barsh, G.S., Seeburg, P.H. and Gelinas, R.E. (1983) : The human growth hormone gene family: Structure and evolution of the chromosomal locus.
Nucl. Acids Res. **11**, 3939 - 3958
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acids Res. **7**, 1513 - 1523
- Blin, N. and Stafford, D.W. (1976) : A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes.
Nucl. Acids Res. **3**, 2303 - 2308
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) : A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **41**, 459 - 472
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) : Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins.
Ann. Rev. Biochem. **50**, 349 - 383

- Brem , G. (1986) : Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht.
Enke Copythek , Enke Verlag Stuttgart
- Brem , G. , Brenig , B. , Goodman , H.M. , Selden , R.C. , Graf , F. , Kruff , B. , Springmann , K. , Hondele , J. , Meyer , J. , Winnacker , E.-L. and Kräußlich , H. (1985) : Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei.
Zuchthygiene **20** , 251 - 252
- Brinster , R.L. , Ritchie , K.A. , Hammer , R.E. , O'Brien , R.L. , Arp , B. and Storb , U. (1983) : Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the spleen of transgenic mice.
Nature **306** , 332 - 336
- Brinster , R.L. , Chen , H.Y. , Messing , A. , van Dyke , T. , Levine , A.J. and Palmiter , R.D. (1984) : Transgenic mice harboring SV40 T-Antigen genes develop characteristic brain tumors.
Cell **37** , 367 - 379
- Brinster , R.L. , Chen , H.Y. , Trumbauer , M.E. , Yagle , M.K. and Palmiter , R.D. (1985) : Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** , 4438 - 4442
- Chada , K. , Magram , J. and Costantini , F. (1986) : An embryonic pattern of expression of a human fetal globin gene in transgenic mice.
Nature **319** , 685 - 689
- Chirgwin , J.M. , Przybyla , A.E. , MacDonald , R.J. and Rutter , W.J. (1979) : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochem. **18** , 5294 - 5299
- Chourrout , D. , Guyomard , R. and Houdebine , L.-M. (1986) : High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) by microinjection into egg cytoplasm.
Aquaculture **51** , 143 - 150
- Church , R.B. , Schaefele , F.J. and Meckling , K. (1985) : Embryo manipulation and gene transfer in livestock.
Can. J. Animal. Sci. **65** , 527 - 537
- Clark , A.J. , Simons , P. , Wilmut , I. and Lathe , R. (1987) : Pharmaceuticals from transgenic livestock.
TIBTECH **5** , 20 - 24
- Cohen , S.N. , Chang , A.C.Y. and Hsu , L. (1972) : Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69** , 2110 - 2114

- Corden , J. , Wasylyk , B. , Buchwalder , A. , Sassone-Corsi , P. , Kedinger , C. and Chambon , P. (1980) : Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes.
Science **209** , 1406 - 1414
- Costantini , F. and Lacy , E. (1981) : Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line.
Nature **294** , 92 - 94
- Coudé , F.X. , Diaz , J. , Morre , M. , Roskam , W. and Roncucci , R. (1984) : Growth hormone releasing factor-production and potential uses in human and veterinary medicine.
Trends in Biotechnology **2** , 83 - 88
- DeNoto , F.M. , Moore , D.D. and Goodman , H.M. (1981) : Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing.
Nucl. Acids Res. **9** , 3719 - 3730
- Dreiding , P. , Staeheli , P. and Haller , O. (1985) : Interferon-induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses.
Virology **140** , 192 - 196
- Dugaiczky , A. , Boyer , H.W. and Goodman , H.M. (1975) : Ligation of *Eco* RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures.
J. Mol. Biol. **96** , 171 - 184
- Dulbecco , R. and Freeman , G. (1959) : Plaque production by the polyoma virus.
Virology **8** , 396 - 397
- Durnam , D.M. , Perrin , F. , Gannon , F. and Palmiter , R.D. (1980) : Isolation and characterization of the mouse metallothionein-I gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** , 6511 - 6515
- Feinberg , A.P. and Vogelstein , B. (1983) : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **132** , 6 - 13
- Feinberg , A.P. and Vogelstein , B. (1984) : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity
Addendum Anal. Biochem. **137** , 266 - 267
- Flood , P.M. , Benoist , Ch. , Mathis , D. and Murphy , D.B. (1986) : Altered I-J phenotype in $E\alpha$ transgenic mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** , 8308 - 8312
- Fotino , M. , Merson , E.J. and Allen , F.H. (1971) : Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood.
Ann. Clin. Lab. Sci. **1** , 131 - 133

- Gerlinger, P., Le Meur, M., Irrmann, C., Renard, P., Wasylyk, C. and Wasylyk, B. (1986) : B-lymphocyte targeting of gene expression in transgenic mice with the immunoglobulin heavy-chain enhancer.
Nucl. Acids Res. **14**, 6565 - 6577
- Glanville, N., Durnam, D.M. and Palmiter, R.D. (1981) : Structure of mouse metallothionein-I gene and its mRNA.
Nature **292**, 267 - 269
- Glisin, V., Crkvenjakov, R. and Byus, C. (1974) : Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation.
Biochem. **13**, 2633 - 2637
- Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. and Seeburg, P.H. (1979) : Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone.
Nature **281**, 544 - 548
- Goldberg, D.A., Posakony, J.W. and Maniatis, T. (1983) : Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the *Drosophila* germ line.
Cell **34**, 59 - 73
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980) : Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 7380 - 7384
- Gordon, J.W. (1983) : Studies of foreign genes transmitted through the germ lines of transgenic mice.
J. Experimental Zool. **228**, 313 - 324
- Gordon, J.W. (1986) : A foreign dihydrofolate reductase gene in transgenic mice acts as a dominant mutation.
Mol. Cell. Biol. **6**, 2158 - 2167
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. and Howard, B.H. (1982) : Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells.
Mol. Cell. Biol. **2**, 1044 - 1051
- Graham, F.L. and van der Eb, A.J. (1973) : A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.
Virology **52**, 456 - 467
- Grunstein, M. and Hogness, D.S. (1975) : Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3961 - 3965

- Gubler, U., Monahan, J.J., Lomedico, P.T., Bhatt, R.S., Collier, K.J., Hoffman, B.J., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N., Zeytin, F., Brazeau, P., Poonian, M.S. and Gage, L.P. (1983) : Cloning and sequence analysis of cDNA for the precursor of human growth hormone-releasing factor, somatocrinin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 4311 - 4313
- Guillemin, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N. and Wehrenberg, W.B. (1982) : Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly.
Science **218**, 585 - 587
- Hager, L.J. and Palmiter, R.D. (1981) : Transcriptional regulation of mouse liver metallothionein-I gene by glucocorticoids.
Nature **291**, 340 - 342
- Haller, O. and Lindenmann, J. (1974) : Athymic (nude) mice express gene for myxovirus resistance.
Nature **250**, 679 - 680
- Haller, O., Arnheiter, H., Gresser, I. and Lindenmann, J. (1979) : Genetically determined, interferon-dependent resistance to influenza virus in mice.
J. Exp. Med. **149**, 601 - 612
- Haller, O., Arnheiter, H., Horisberger, M.A., Gresser, I. and Lindenmann, J. (1980 a) : Interaction between interferon and host genes in antiviral defense.
Ann. NY Acad. Sci. **350**, 558 - 565
- Haller, O., Arnheiter, H., Lindenmann, J. and Gresser, I. (1980 b) : Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus.
Nature **283**, 660 - 662
- Haller, O., Arnheiter, H., Gresser, I. and Lindenmann, J. (1981) : Virus-specific interferon action/Protection of newborn *Mx* carriers against lethal infection with influenza virus.
J. Exp. Med. **154**, 199 - 203
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad jr., C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985 a) : Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection.
Nature **315**, 680 - 683
- Hammer, R.E., Brinster, R.L., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. and Mayo, K.E. (1985 b) : Expression of human growth hormone-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth.
Nature **315**, 413 - 416

- Hammer , R.E. , Idzerda , R.L. , Brinster , R.L. and McKnight , G.S. (1986) : Estrogen regulation of the avian transferrin gene in transgenic mice.
Mol. Cell. Biol. **6** , 1010 - 1014
- Hanahan , D. (1983) : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166** , 557 - 580
- Hanahan , D. (1984) : Oncogenes in transgenic mice.
Nature **312** , 503 - 504
- Hanahan , D. (1985) : Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes.
Nature **315** , 115 - 122
- Heinrich , P. (1986 a) : Guidelines for quick and simple plasmid sequencing.
Boehringer Mannheim GmbH , *Biochemica*
- Heinrich , P. (1986 b) : Plasmid sequencing: An attractive alternative to conventional sequencing techniques.
Colloquium **2** , Boehringer Mannheim
- Hogan , B. (1983) : Enhancers, chromosome position effects, and transgenic mice.
Nature **306** , 313 - 314
- Holmes , D.S. and Quigley , M. (1981) : A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.
Anal. Biochem. **114** , 193 - 197
- Horwitz , J.P. , Chua , J. , Curby , R.J. , Thomson , A.J. , Da Rooge , M.A. , Fischer , B.E. , Mauricio , J. and Khundt , I. (1964) : Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides.
J. Med. Chem. **7** , 547 - 548
- Isaacs , A. and Lindenmann , J. (1957) : Virus interference . I. The interferon.
Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **147** , 258 - 267
- Jaenisch , R. (1974) : Infection of mouse blastocysts with SV40 DNA : Normal development of infected embryos and persistence of SV40-specific DNA sequences in the adult animals.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **39** , 375 - 380
- Jaenisch , R. and Mintz , B. (1974) : Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71** , 1250 - 1254

- Jaenisch, R. (1976) : Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 1260 - 1264
- Jaenisch, R., Jähner, D., Nobis, P., Simon, I., Löhler, J., Harbers, K. and Grotkopp, D. (1981) : Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice.
Cell **24**, 519 - 529
- Jaenisch, R., Harbers, K., Schnieke, A., Löhler, J., Chumakov, I., Jahner, D., Grotkopp, D. and Hoffman, E. (1983) : Germ line integration of Moloney murine leukemia virus at the Mov13 locus leads to recessive lethal mutation and early embryonic death.
Cell **21**, 209 - 216
- Kägi, J.H.R., Vasak, M., Lerch, R., Gilg, D.E.O., Huziker, P., Bernhard, N.R. and Good, M. (1984) : Structure of mammalian metallothionein.
Environ. Health Perspect. **54**, 93 - 103
- Kelly, F. and Condamine, H. (1982) : Tumor viruses and early mouse embryo.
Biochem. Biophys. Acta **651**, 105 - 141
- Kelly, R.B., Cozzarelli, N.R., Deutscher, M.P., Lehman, I.R. and Kornberg, A. (1970) : Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break.
J. Biol. Chem. **245**, 39 - 45
- Khillan, J.S., Schmidt, A., Overbeek, P.A., de Crombrughe, B. and Westphal, H. (1986) : Developmental and tissue-specific expression directed by α_2 type I collagen promoter in transgenic mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 725 - 729
- King, P.V. and Blakesley, R.W. (1986) : Optimizing DNA ligations for transformation.
Focus **8**, 1 - 3
- Kollias, G., Wrighton, N., Hurst, J. and Grosveld, F. (1986) : Regulated expression of human γ -, β -, and hybrid $\gamma\beta$ -globin genes in transgenic mice: Manipulation of the developmental expression patterns.
Cell **46**, 89 - 94
- Kraemer, D.C. (1986) : Strategien für einen Einsatz des Gentransfers in der Rinderproduktion.
Zuchthygiene **58**, 382 - 393
- Kräußlich, H. (1986) : Criteria for useful gene transfer.
3rd World Congr. of Genetics applied to Livestock Production, Lincoln (Nebraska) **12**, 22 - 31

- Krug , R.M. , Shaw , M. , Broni , B. , Shapiro , G. and Haller , O.
(1985) : Inhibition of influenza viral mRNA synthesis
in cells expressing the interferon-induced *Mx* gene product.
J. Virol. **56** , 201 - 206
- Krumlauf , R. , Chapman , V.M. , Hammer , R.E. , Brinster , R.
and Tilgham , S.M. (1986) : Differential expression of
 α -fetoprotein genes on the inactive X chromosome in
extraembryonic and somatic tissues of a transgenic mouse line.
Nature **319** , 224 - 226
- Land , R.B. and Wilmot , I. (1987) : Gene transfer and animal breeding.
Theriogenology **27** , 169 - 179
- Leder , A. , Pattengale , P.K. , Kuo , A. , Stewart , T.A. and
Leder , P. (1986) : Consequences of widespread
deregulation of the *c-myc* gene in transgenic mice:
Multiple neoplasms and normal development.
Cell **45** , 485 - 495
- Lehrach , H. , Diamond , D. , Wozney , J.M. and
Boedtker , H. (1977) : RNA molecular weight
determinations by gel electrophoresis under denaturing
conditions, a critical reexamination.
Biochem. **16** , 4743 - 4751
- Le Meur , M. , Gerlinger , P. , Benoist , Ch. and Mathis , D.
(1985) : Correcting an immune-response deficiency by
creating *E_α* gene transgenic mice.
Nature **316** , 38 - 42
- Lindenmann , J. (1962) : Resistance of mice to mouse adapted
influenza A virus.
Virology **16** , 203 - 204
- Lindenmann , J. , Lane , C.A. and Hobson , D. (1963) : The
resistance of A2G mice to myxoviruses.
J. Immunol. **90** , 942 - 951
- Lindenmann , J. (1964) : Inheritance of resistance to influenza in mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **116** , 505 - 509
- Lipp , M. (1985) : Persönliche Mitteilung
- Liskay , R.M. (1986) : Manipulation just off target.
Nature **324** , 13
- Lo , C.W. (1983) : Transformation by iontophoretic microinjection
of DNA: Multiple integrations without tandem insertions.
Mol. Cell. Biol. **3** , 1803 - 1814
- Lohse , J.K. (1985) : Progress towards transgenic cattle.
Theriogenology **23** , 205
- Lovell-Badge , R.H. (1985) : Transgenic animals - New advances
in the field.
Nature **315** , 628 - 629

- Low, M.J., Hammer, R.E., Goodman, R.H., Habener, J.F., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985) : Tissue-specific posttranslational processing of pre-prosomatostatin encoded by a metallothionein-somatostatin fusion gene in transgenic mice. *Cell* **41**, 211 - 219
- Low, M.J., Lechan, R.M., Hammer, R.E., Brinster, R.L., Habener, J.F., Mandel, G. and Goodman, R.H. (1986) : Gonadotroph-specific expression of metallothionein fusion genes in pituitaries of transgenic mice. *Science* **231**, 1002 - 1004
- Magram, J., Chada, K. and Costantini, F. (1985) : Developmental regulation of a cloned adult β -globin gene in transgenic mice. *Nature* **315**, 338 - 340
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) : Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York
- Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D. and Goodman, H.M. (1979) : Human growth hormone: Complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* **205**, 602 - 607
- Marx, J.L. (1985) : Making mutant mice by gene transfer. *Science* **228**, 1516 - 1517
- Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) : Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**, 499 - 560
- Mayo, K.E., Vale, W., Rivier, J., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1983) : Expression-cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone-releasing factor. *Nature* **306**, 86 - 88
- Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Lebo, R.V., Bruce, B.D., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985) : Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor : Structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 63 - 67
- McConaughy, B.L., Laird, C.D. and McCarthy, B.J. (1969) : Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochem.* **8**, 3289 - 3295
- McLauchlan, J., Gaffney, D., Whitton, J.L. and Clements, J.B. (1985) : The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. *Nucl. Acids Res.* **13**, 1347 - 1368

- Messing , A. , Chen , H.Y. , Palmiter , R.D. and Brinster , R.L.
(1985) : Peripheral neuropathies, hepatocellular
carcinomas and islet cell adenomas in transgenic mice.
Nature **316** , 461 - 463
- Mintz , B. (1962) : Formation of genotypically mosaic mouse embryo.
Am. Zool. **2** , 432
- Morello , D. , Moore , G. , Salmon , A.M. , Yaniv , M. and
Babinet , C. (1986) : Studies on the expression of an
H-2K/human growth hormone fusion gene in giant
transgenic mice.
EMBO J. **5** , 1877 - 1883
- Noteborn , M. (1987) : Persönliche Mitteilung
- Ozato , K. , Kondoh , H. , Inohara , H. , Iwamatsu , T. ,
Wakamatsu , Y. and Okada , T.S. (1986) : Production
of transgenic fish: Introduction and expression of
chicken δ -crystallin gene in medaka embryos.
Cell Differentiation **19** , 237 - 244
- Palmiter , R.D. , Brinster , R.L. , Hammer , R.E. , Trumbauer ,
M.E. , Rosenfeld , M.G. , Birnberg , N.C. and
Evans , R.M. (1982 a) : Dramatic growth of mice that
develop from eggs microinjected with metallothionein-
growth hormone fusion genes.
Nature **300** , 611 - 615
- Palmiter , R.D. , Chen , H.Y. and Brinster , R.L. (1982 b) :
Differential regulation of metallothionein-thymidine
kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring.
Cell **29** , 701 - 710
- Palmiter , R.D. , Norstedt , G. , Gelinas , R.E. , Hammer , R.E.
and Brinster , R.L. (1983) : Metallothionein-human GH
fusion genes stimulate growth of mice.
Science **222** , 809 - 814
- Palmiter , R.D. and Brinster , R.L. (1985) : Transgenic Mice.
Cell **41** , 343 - 345
- Palmiter , R.D. , Chen , H.Y. , Messing , A. and Brinster , R.L.
(1985) : SV40 enhancer and large-T antigen are
instrumental in development of choroid plexus tumours
in transgenic mice.
Nature **316** , 457 - 460
- Papaiannou , V.E. , Gardner , R.L. , McBurney , M.W. ,
Babinet , C. and Evans , M.J. (1978) : Participation of
cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis.
J. Embryol. Exp. Morphol. **44** , 93 - 104
- Pellicer , A. , Wigler , M. , Axel , R. and Silverstein , S. (1978) :
The transfer and stable integration of the HSV
thymidine kinase gene into mouse cells.
Cell **14** , 133 - 141

- Cell* **14**, 133 - 141
- Pena, A. de la, Lörz, H. and Schell, J. (1987) : Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature* **325**, 274 - 276
- Perucho, M., Hanahan, D. and Wigler, M. (1980) : Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell* **22**, 309 - 317
- Pinkert, C.A., Widera, G., Cowing, C., Heber-Katz, E., Palmiter, R.D., Flavell, R.A. and Brinster, R.L. (1985) : Tissue-specific, inducible and functional expression of the E α^d MHC class II gene in transgenic mice. *EMBO J.* **4**, 2225 - 2230
- Radice, G. and Costantini, F. (1986) : Tissue-specific DNase I hypersensitive sites in a foreign globin gene in transgenic mice. *Nucl. Acids Res.* **14**, 9765 - 9780
- Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977) : Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237 - 251
- Rivier, J., Spiess, J., Thorner, M. and Vale, W. (1982) : Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* **300**, 276 - 278
- Robins, D.M., Ripley, S., Henderson, A.S. and Axel, R. (1981) : Transforming DNA integrates into the host chromosome. *Cell* **23**, 29 - 39
- Rokkones, E., Aleström, P., Skjervold, H. and Gautvik, K.M. (1985) : Development of a technique for microinjection of DNA into salmonid eggs. *Acta Physiol. Scand.* **124**, suppl. 542, 417
- Roskam, W.G. and Rougeon, F. (1979) : Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. *Nuc. Acids Res.* **7**, 305 - 320
- Ross, K. (1987) : Zur Erstellung transgener Kaninchen durch DNA-Mikroinjektion in Zygotenvorkerne. *Diss. med. vet.*, München
- Ross, S.R. and Solter, D. (1985) : Glucocorticoid regulation of mouse mammary tumor virus sequences in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5880 - 5884
- Sanger, F., Micklen, S. and Coulson, A.R. (1977) : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463 - 5467

- Sawicki , W. , Baranska , W. and Koprowski , H. (1971) :
Susceptibility of unfertilized and fertilized mouse eggs
to simian virus 40 and Moloney sarcoma virus.
J. Natl. Cancer Inst. **47** , 1045 - 1051
- Searle , P.F. , Davidson , B.L. , Stuart , G.W. , Wilkie , T.M. ,
Norstedt , G. and Palmiter , R.D. (1984) :
Regulation, linkage and sequence of mouse
metallothionein-I and II genes.
Mol. Cell. Biol. **4** , 1221 - 1230
- Seeburg , P.H. , Shine , J. , Martial , J.A. , Baxter , J.D. and
Goodman , H.M. (1977) : Nucleotide sequence and
amplification in bacteria of structural gene for rat
growth hormone.
Nature **270** , 486 - 494
- Seeburg , P.H. , Sias , S. , Adelman , J. , de Boer , H.A. ,
Hayflick , J. , Jhurani , P. , Goeddel , D.V. and
Heyneker , H.L. (1983) : Efficient bacterial expression
of bovine and porcine growth hormones.
DNA **2** , 37 - 45
- Sharp , P.A. , Sudgen , B. and Sambrook , J. (1973) : Detection of
two restriction endonuclease activities in *Haemophilus*
parainfluenzae using analytical agarose-ethidium
bromide electrophoresis.
Biochem. **12** , 3055 - 3063
- Small , J.A. , Khoury , G. , Jay , G. , Howley , P.M. and
Scangos , G.A. (1986 a) : Early regions of JC virus
and BK virus induce distinct and tissue-specific tumors
in transgenic mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** , 8288 - 8292
- Small , J.A. , Scangos , G.A. , Cork , L. , Jay , G. and
Khoury , G. (1986 b) : The early region of human
papovavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice.
Cell **46** , 13 - 18
- Smith , C. , Meuwissen , T.H.E. and Gibson , J.P. (1987) : On the
use of transgenes in livestock improvement.
Anim. Breeding Abstract **55** , 1 - 10
- Smith , M. , Leung , D.W. , Gillam , S. , Astell , C.R. ,
Montgomery , D.L. and Hall , B.D. (1979) : Sequence
of the gene for iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*.
Cell **16** , 753 - 761
- Southern , E.M. (1975) : Detection of specific sequences among
DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98** , 503 - 517
- Spradling , A.C. and Rubin , G.M. (1983) : The effect of
chromosomal position on the expression of the
Drosophila xanthine dehydrogenase gene.
Cell **34** , 47 - 57

- Staeheli, P. and Haller, O. (1985) : Interferon-induced human protein with homology to protein Mx of influenza virus-resistant mice.
Mol. Cell. Biol. **5** , 2150 - 2153
- Staeheli, P. , Fach, J. , Mortier, C. and Haller, O. (1985) :
Interferon-induced homologs to mouse Mx protein in humans and rats.
in: *The Biology of the Interferon System 1985*
W.E. Stewart II and H. Schellekens , eds.
Elsevier Biomedical Press , Amsterdam , i.p.
- Staeheli, P. , Pravtcheva, D. , Lundin, L.-G. , Acklin, M. ,
Ruddle, F. , Lindenmann, J. and Haller, O. (1986 a) :
Interferon-regulated influenza virus resistance gene Mx
is localized on mouse chromosome 16.
J. Virol. , i.p.
- Staeheli, P. , Haller, O. , Boll, W. , Lindenmann, J. and
Weissmann, C. (1986 b) : Mx Protein: Constitutive
expression in 3T3 cells transformed with cloned
Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus.
Cell **44** , 147 - 158
- Steinmetz, M. (1985) : Immune response restored by gene therapy in mice.
Nature **316** , 14 - 15
- Stewart, T.A. , Pattengale, P.K. and Leder, P. (1984) :
Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic
mice that carry and express MTV/*myc* fusion genes.
Cell **38** , 627 - 637
- Storb, U. , O'Brien, R.L. , McMullen, M.D. , Gollahon, K.A.
and Brinster, R.L. (1984) : High expression of cloned
immunoglobulin κ gene in transgenic mice is restricted
to B lymphocytes.
Nature **310** , 238 - 241
- Swanson, L.W. , Simmons, D.M. , Arriza, J. , Hammer, R. ,
Brinster, R. , Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985) : Novel
developmental specificity in the nervous system of transgenic
animals expressing growth hormone fusion genes.
Nature **317** , 363 - 366
- Swift, G.H. , Hammer, R.E. , MacDonald, R.J. and Brinster, R.L. (1984) : Tissue-specific expression of the rat
pancreatic elastase I gene in transgenic mice.
Cell **38** , 639 - 646
- Tarkowski, A.K. (1961) : Mouse chimeras developed from fused eggs.
Nature **190** , 857 - 860
- Telford, J.L. , Kressmann, A. , Koski, R.A. , Grosschedl, R. ,
Müller, F. , Clarkson, S.G. and Birnstiel, M.L. (1979) :
Delimitation of a promoter for RNA polymerase III by
means of a functional test.

- Thomas, P.S. (1980) : Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 5201 - 5205
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R. (1986) : Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene.
Nature **324**, 34 - 38
- Townes, T.M., Lingrel, J.B., Chen, H.Y., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1985) : Erythroid-specific expression of human β -globin genes in transgenic mice.
EMBO J. **4**, 1715 - 1723
- Van der Putten, H., Botteri, F.M., Miller, A.D., Rosenfeld, M.G., Fan, H.F., Evans, R.M. and Verma, I.M. (1985) : Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 6148 - 6152
- Varshney, U., Jahroudi, N., Foster, R. and Gedamu, L. (1986) : Structure, organization, and regulation of human metallothionein I_F gene:
Differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids.
Mol. Cell. Biol. **6**, 26 - 37
- Vieira, J. and Messing, J. (1982) : The pUC-plasmids, a M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene **19**, 259 - 268
- Wagner, E.F., Covarrubias, L., Stewart, T.A. and Mintz, B. (1983) : Prenatal lethalties in mice homozygous for human growth hormone gene sequences integrated in the germ line.
Cell **35**, 647 - 655
- Wagner, T.E. (1985) : The role of gene transfer in animal agriculture and biotechnology.
Can. J. Anim. Sci. **65**, 539 - 552
- Wallace, R.B., Jakuson, M.J., Suggs, S.V., Miyaski, K., Bhatt, R. and Itakura, K. (1981) : A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322.
Gene **16**, 21 - 26
- Ward, K.A., Franklin, I.R., Murray, J.D., Nancarrow, C.D., Raphael, K.A., Rigby, N.W., Byrne, C.R., Wilson, B.W. and Hunt, C.L. (1986) : The direct transfer of DNA by embryo microinjection.
3rd World Congr. of Genetics applied to Livestock Production, Lincoln (Nebraska) **12**, 6 - 12

- Weiss , B. , Jacquemin-Sablon , A. , Live , T.R. , Fareed , G.C. and Richardson , C.C. (1968) : Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. I. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with Bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243** , 4543 - 4555
- Wetekam, W. (1985) : Persönliche Mitteilung
- Williams , J.G. (1982) : Mouse and supermouse. *Nature* **300** , 575
- Wilson , C. , Cross , G.S. and Woodland , H.R. (1986) : Tissue-specific expression of actin genes injected into *Xenopus* embryos. *Cell* **47** , 589 - 599
- Winberg , G. and Hammarskjöld , M.L. (1980) : Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. *Nucl. Acids Res.* **8** , 253 - 264
- Winnacker , E.-L. (1984) : Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie. *Verlag Chemie VCH* , Weinheim
- Woychik , R.P. , Stewart , T.A. , Davis , L.G. , D'Eustachio , P. and Leder , P. (1985) : An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature* **318** , 36 - 40
- Yamamura , K. , Kikutani , H. , Folsom , V. , Clayton , L.K. , Kimoto , M. , Akira , S. , Kashiwamura , S. , Tonegawa , S. and Kishimoto , T. (1985) : Functional expression of a microinjected $E_d\alpha$ gene in C57BL/6 transgenic mice. *Nature* **316** , 67 - 69
- Yanisch-Perron , C. , Vieira , J. and Messing , J. (1985) : Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** , 103 - 119
- Zhu , Z. , Li , G. , He , L. and Chen , S. (1985) : Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Z. angew. Ichthyol.* **1** , 31 - 34

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1985 bis April 1987 auf Anregung von Herrn Prof. Dr. H. Kräußlich (Lehrstuhl für Tierzucht) am Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und von Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Kräußlich möchte ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und die Unterstützung, die er mir während der Arbeit zuteil werden ließ, danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker, an dessen hervorragend ausgestattetem Institut ich durch die großzügige Bereitstellung eines Laborplatzes freizügig und völlig unbegrenzt arbeiten durfte.

Ausdrücklich möchte ich auch das große Interesse von Herrn Prof. Dr. H. Kräußlich und Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker am Fortgang meiner Arbeit erwähnen.

Weiterhin möchte ich ganz besonders und herzlich Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. habil. G. Brem für die unzähligen, anregenden Gespräche und kritischen Diskussionen, die unmittelbare Betreuung meiner Arbeit und sein persönliches Engagement danken. Ohne seinen Einsatz und den der Mitarbeiter des Embryo-transfers wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich Herrn Dr. M. Lipp aussprechen, der nie müde war, jederzeit auf molekularbiologisch-methodische Fragestellungen einzugehen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. P. Heinrich, der mich in die "Kunst" der Doppelstrangsequenzierung einführte.

Der H. Wilhelm Schaumann Stiftung bin ich für die Gewährung eines Stipendiums im Zeitraum von Oktober 1985 bis Oktober 1986 zu Dank verpflichtet.

Meiner Frau möchte ich für ihre Geduld und ihr Verständnis danken.

Meinen Eltern möchte ich sehr herzlich für alle Unterstützungen während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Herrn Mathias Müller danke ich für die Entlastung in den letzten Wochen meiner Arbeit. Ferner gilt mein besonderer Dank Herrn Dipl.-chem. Michael Meisterernst, Frl. Dipl.-chem. Irene Gander, Herrn Dr. Peter Hartl, Herrn Dipl.-chem. Thomas Metzler, Herrn Dipl.-biol. Thomas Dobner, Frl. Dipl.-biol. Karin Thalmeier, Frl. Gertraud Stelzer, Frau Renate Schilling und allen Kolleginnen und Kollegen in unserem Labor, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, für ihre Hilfe und vielen Ratschläge.

Lebenslauf

Name	Bertram Brenig
Geburtsdatum	18.12.1959
Geburtsort	München
Eltern	Prof. Dr. Wilhelm Brenig Dr. Ruth Brenig, geb. Woll
Familienstand	seit 24.11.1984 verheiratet mit Dr. Afra von Putzer Reibegg Brenig, geb. von Putzer Reibegg
Kinder	Clara * 5.6.1986
1966 - 1967	Grundschule Freimann, München
1968 - 1969	Grundschule Baldham
1970 - 1979	math.-nat. Gymnasium Vaterstetten
1979	Abitur
1979	Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München
Dez. 1984	Abschluß des Studiums mit dem dritten Teil der tierärztlichen Prüfung
April 1985 - April 1987	Doktorarbeit am Institut für Tierzucht und Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät (Lehrstuhl: Prof. Dr. H. Kräußlich) und am Institut für Biochemie (Lehrstuhl: Prof. Dr. E.-L. Winnacker) der Ludwig-Maximilians-Universität München (Thema: "Klonierung mikroinjizierbarer Genkonstrukte und deren Nachweis in transgenen Tieren - Ein Beitrag zur Nutzung transgener Tiere in der Tierzucht -")

